

PA 17363

012711-11-11

MENTOR: Dr Jelena Knežević Vučković, vanredni profesor
Biološki fakultet, Beograd

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

ČLANOVI KOMISIJE: Dr Jelena Knežević Vučković, vanredni profesor
Biološki fakultet, Beograd

Dr Dejan Stanković, redovni profesor
Biološki fakultet, Beograd

Tatjana Kostić

Dr Ljiljana Čupić, redovni profesor
Biološki fakultet, Beograd

MOLEKULARNA OSNOVA GENETIČKIH REARANŽMANA
IZAZVANIH IS5 ELEMENTIMA U *polA1* MUTATORSKOM SOJU

Escherichia coli K12

DATUM ODBRANE: _____

Doktorska disertacija

DATUM PROMOCIJE: _____

POKTRAT NAUKA: _____

Beograd, 2001. godine

**MENTOR: Dr Jelena Knežević Vukčević, vanredni profesor
Biološki fakultet, Beograd**

**ČLANOVI KOMISIJE: Dr Jelena Knežević Vukčević, vanredni profesor
Biološki fakultet, Beograd**

**Dr Draga Simić, redovni profesor
Biološki fakultet, Beograd**

**Dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor
Biološki fakultet, Beograd**

DATUM ODBRANE: _____

DATUM PROMOCIJE: _____

DOKTORAT NAUKA: _____

POSVEĆENO

MOJIM RODITELJIMA

ABSTRACT

In our earlier work on the 1941 model, we have shown that the 1941 model is a good approximation to the 1941 model. The 1941 model is a good approximation to the 1941 model. The 1941 model is a good approximation to the 1941 model.

This work presents a study of the 1941 model. The 1941 model is a good approximation to the 1941 model. The 1941 model is a good approximation to the 1941 model. The 1941 model is a good approximation to the 1941 model.

Key words: 1941 model, 1941 model, 1941 model, 1941 model, 1941 model.

DOS ES MAGNA PARÉNTIUM VIRTUS.

Vrlina roditelja je veliki miraz.

ABSTRAKT

U našem prethodnom radu na *polA1* mutantima pokazali smo da *polA1* kreira mutacije isključivo tipa minus fs i delecija. U mutacionom spektru histidinskih auktotrofa bila je prisutna i jedna specifična kategorija delecija, velike delecije, koje su prolazile preko celog *his* operona. Veličina delecija je ukazivala da one nastaju u procesu rekombinacije između homologih sekvenci, a poznato je da u *polA* mutantima dolazi do povećane frekvence rekombinacije.

Ovaj rad predstavlja završni deo naše originalne studije *polA1* indukovane mutageneze praćene na histidinskom operonu hromozoma *E.coli*. Analizirani su molekularni mehanizmi nastajanja velikih delecija, ili proces rekombinacije koji promovise ove genomske rearanžmane. Pokazali smo da velike delecije nastaju kao rezultat rekombinacije između dve IS5 sekvence koje se nalaze sa obe strane *his* operona. Sve četiri nezavisno izolovane delecije su bile jednake i iznosile su 35 kb. Analizom sekvence rekombiniranih IS5 elemenata pokazali smo da rekombinacija uvek prolazi kroz levi terminus IS5 i da se odigrava po tipu "site specific" rekombinacije. Levi terminus IS5 elementa ima karakteristično zakrivljenje DNK uslovljeno njenom primarnom strukturom i sadrži mesto za vezivanje IHF proteina. Rezultati ovog rada zajedno sa podacima iz literature ukazuju na moguću ulogu IHF proteina u nastajanju velikih delecija i u procesu rekombinacije. Primenom PCR tehnologije pokazali smo da je frekvencija nastajanja velikih delecija povećana kod *polA1* i *dam* mutanata i da velike delecije nastaju na *recA* nezavisan način. *PolA1* ne pokazuje nikakvu specifičnost jer se rekombinacija dešava na isti način i kod divljeg soja, ali je frekvencija rekombinacije dva puta povećana u *polA1* mutantima u odnosu na divlji soj.

Ključne reči: mutageneza - *polA1* - rekombinacija - delecije - IS5 – PCR

ABSTRACT

In our previous work on *polA1* mutants we have shown that *polA1* creates exclusively minus fs and deletions types. In mutational spectra of histidine auxotrophs, one specific category of deletions, large deletions, that cover all *his* operon, was present. The size of deletions pointed out that they appear in a process of recombination between homology sequences; it is known that *polA1* mutants show an increased frequency of recombination.

This work presents final part of our original study of *polA1*-induced mutagenesis followed on histidine operon of chromosome *E.coli*. Molecular mechanisms of appearances of large deletions, or process of recombination promoting this chromosomal rearrangement, was analysed. We showed that large deletions appear as a result of recombination between two IS5 sequences located on both sides of *his* operon. Four independently isolated deletions were identical, 35 kb long. Sequence analysis of recombinant IS5 elements was show that recombination always goes through the left terminus of IS5, as a "site specific" recombination. Left terminus of IS5 contains a characteristic sequence-directed bent DNA, including a binding site for IHF protein. The data from literature, including the present results, point to a possible role of IHF protein in appearance of large deletions and process of recombination. Applying a PCR technology, we show that the frequency of large deletions is increased in *polA1* and *dam* mutants, and that large deletions appear on *recA* independent way. *PolA1* is not sequence specific because the process of recombination between two IS5 is identical in wild type and *polA* mutants, but the frequency of recombination is two times higher in regard to wild type.

Key words: mutagenesis - *polA1*- recombination – deletions - IS5 – PCR

SADRŽAJ

	Strana
1. UVOD	1
1.1. GENETIČKI REARANŽMANI I REKOMBINACIJA	1
1.2. INSERCIONE SEKVENCE	10
1.3. STRUKTURA I FUNKCIJA IS5 ELEMENTA	13
1.4. SPONTANA MUTGENEZA I <i>polA1</i> MUTATORSKI SOJ	16
2. CILJ RADA	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. BIOLOŠKI MATERIJAL	23
3.2. MEDIJUMI ZA RAST I ODRŽAVANJE BAKTERIJA I FAGA	26
3.3. IZOLOVANJE I MAPIRANJE HISTIDINSKIH AUKSOTROFA	26
3.4. METODE IZOLOVANJA PLAZMIDNE DNK	27
3.4.1. Mini metoda (alkalna liza)	27
3.4.2. Izolovanje plazmida na velikoj skali metodom CsCl	28
3.5. METODE IZOLOVANJA HROMOZOMALNE DNK	28
3.5.1. Mini metoda	28
3.5.2. Mini metoda – PURAGENE DNA Isolation kit	29
3.5.3. Izolovanje hromozomalne DNK na velikoj skali metodom CsCl	30
3.6. METODE RADA SA BAKTERIOFAGIMA	30
3.6.1. Umnožavanje λ faga i izolovanje fagne DNK	30
3.6.2. Umnožavanje faga M13 i izolovanje DNK	31
3.7. PRIPREMA KOMPETENTNIH ĆELIJA	32
3.8. TRANSFORMACIJA BAKTERIJA	33

3.9. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK	34
3.9.1. Digestija DNK	34
3.9.2. Ligacija DNK	34
3.10. ELEKTROFOREZA I ELEKTROELUCIJA DNK	35
3.10.1. Elektroforeza DNK	35
3.10.2. Elektroforetsko eluiranje	35
3.11. OBELEŽAVANJE DNK PROBE RADIOAKTIVNIM IZOTOPOM	36
3.12. HIBRIDIZACIJA	36
3.12.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane	36
3.12.2. Hibridizacija membrana sa probom	37
3.13. PCR METODOLOGIJA	38
3.13.1. Standardni PCR	38
3.13.2. PCR iz jedne kolonije	39
3.13.3. Sekundarni PCR	40
3.13.4. Multipleks PCR	40
3.14. SEKVENCIRANJE	42
3.14.1. Klasična metoda sekvenciranja	42
3.14.2. Automatsko sekvenciranje	43
4. REZULTATI	45
4.1. MAPIRANJE HISTIDINSKIH AUKSOTROFA IZOLOVANIH IZ <i>polA1</i> SOJEVA	45
4.2. MAPIRANJE KRAJEVA DELECIJE	46
4.3. ANALIZA KLONA 351 I KONSTRUISANJE DNK PROBA ZA MAPIRANJE “DESNOG” KRAJA DELECIJE	53
4.4. ANALIZA LEVOG KRAJA DELECIJE I DETEKCIJA IS5 SA OBE STRANE HIS OPERONA	58
4.5. ANALIZA VELIKIH DELECIJA PROMOVISANIH IS5 ELEMENTIMA PCR TEHNOLOGIJOM	61
4.6. ODREĐIVANJE PRIMARNE STRUKTURE REKOMBINOVANOG IS5 ELEMENTA	64
4.7. KVANTIFIKACIJA REKOMBINACIONOG DOGAĐAJA U DIVLJEM SOJU I <i>polA1</i> MUTANTU PRIMENOM PCR METODOLOGIJE	70
4.7.1. Određivanje senzitivnosti PCR metode	72

4.7.2. Optimizacija uslova za kvantifikaciju rekombinacije između dve IS5 primenom PCR-a	77
4.7.3. Utvrđivanje razlike u frekvenci rekombinacije između divljeg soja i <i>polA1</i> primenom metode multipleks PCR-a	82
4.8. UTVRĐIVANJE <i>recA</i> ZAVISNOSTI REKOMBINACIJE IZMEĐU DVE IS5 SEKVENCE PRIMENOM METODE PCR-A	85
5. DISKUSIJA	87
6. ZAKLJUČCI	103
7. LITERATURA	104
8. PRILOZI	116
PRILOG 1	116
PRILOG 2	117
PRILOG 3	118
PRILOG 4	119
PRILOG 5	120
PRILOG 6	121
PRILOG 7	122
PRILOG 8	123

UVOD

DOCTRÍNA EST FRUCTUS DULCIS RADÍCIS AMÁRAE.

Nauka je sladak plod gorkog korena.

1. UVOD

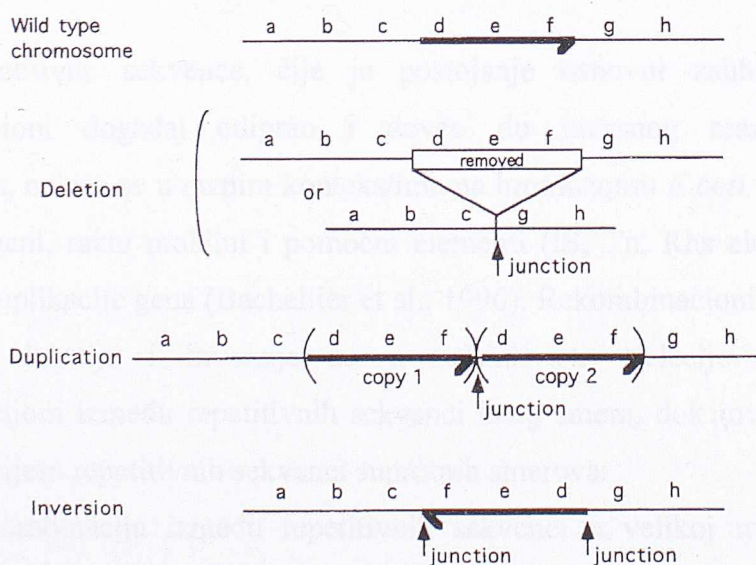
1.1. GENETIČKI REARANŽMANI I REKOMBINACIJA

U procesu replikacije i reparacije DNK povremeno dolazi do formiranja krupnih hromozomalnih rearanžmana - delecija, duplikacija, inverzija, insercija i translokacija – koji mogu imati velike implikacije na strukturu hromozoma, uključujući i promenu genetičke mape (Roth et al., 1996). Pomenuti genetički rearanžmani su mutacioni događaji koji podrazumevaju velike promene DNK, reda veličine od više stotina ili hiljada bp. S obzirom na to da ovakvi genetički rearanžmani mogu uključiti vrlo veliki broj gena, njihov nastanak se umnogome može odraziti na funkciju same ćelije. Po ovome se genetički rearanžmani razlikuju od ostalih mutacionih događaja. Poznavanje molekularne osnove ovih rearanžmana može biti vrlo značajno u oblasti analitičke genetike ili evolucije.

Svi pomenuti genetički rearanžmani nastaju spontano u veoma niskoj frekvenci. Među mutacijama nastalim indukcijom raznim egzogenim mutagenima, sa izuzetkom velikih delecija, genetički rearanžmani se takođe sreću u veoma niskoj frekvenci tako da praktično i nema razlike između spontanih i indukovanih (Hatchinson, 1996). Međutim, velike delecije se mogu indukovati agensima koji oštećuju DNK: jonizujućim zračenjem, koje izaziva dvolančane prekide (Geigl and Eckardt-Schupp, 1991) i azotnom kiselinom koja formira "cross-link" između lanaca (Dubelman and Schapiro, 1977). Kod bakterija tretiranih raznim drugim

mutagenim agensima, frekvencija velikih delecija praktično je jednaka frekvenciji spontanijih.

Velike delecije se najčešće sreću među genetičkim rearanžmanima i najviše su izučavane od svih pomenutih rearanžmana. Jedan od razloga je svakako i taj što su one mnogo jednostavnije za detektovanje u odnosu na druge rearanžmane. Veličina delecija može biti desetine i stotine kb ukoliko deletirani region nije letalan za ćeliju, što znači da je jedini ograničavajući faktor za postojanje velikih delecija zahtev za ćelijsku vijabilnost. U proseku, većina velikih delecija iznosi manje od 1% veličine hromozoma (Roth et al., 1996). Delecije i duplikacije dovode do promene u količini genetičke informacije. Delecije dovode do eliminacije određenog segmenta i do gubitka informacije, dok se kod duplikacija određena informacija amplifikuje, odnosno udvostručava. U oba slučaja menja se konstelacija hromozoma pri čemu se u tački spoja kreira jedna nova sekvenca. Kod inverzija, koje se inače najređe sreću, ne dolazi do promene količine genetičke informacije, već samo do promene orijentacije određenog segmenta DNK. U tom slučaju dolazi do kreiranja dveju novih sekvenci na krajevima invertovanog segmenta, tj. u tačkama spoja (slika 1). Sa aspekta fenotipa, kod delecija i duplikacija novoformirana sekvenca može imati nove funkcionalne konsekvence (nedostatak ili



Slika 1. Osnovni hromozomalni rearanžmani (Roth et al., 1996)

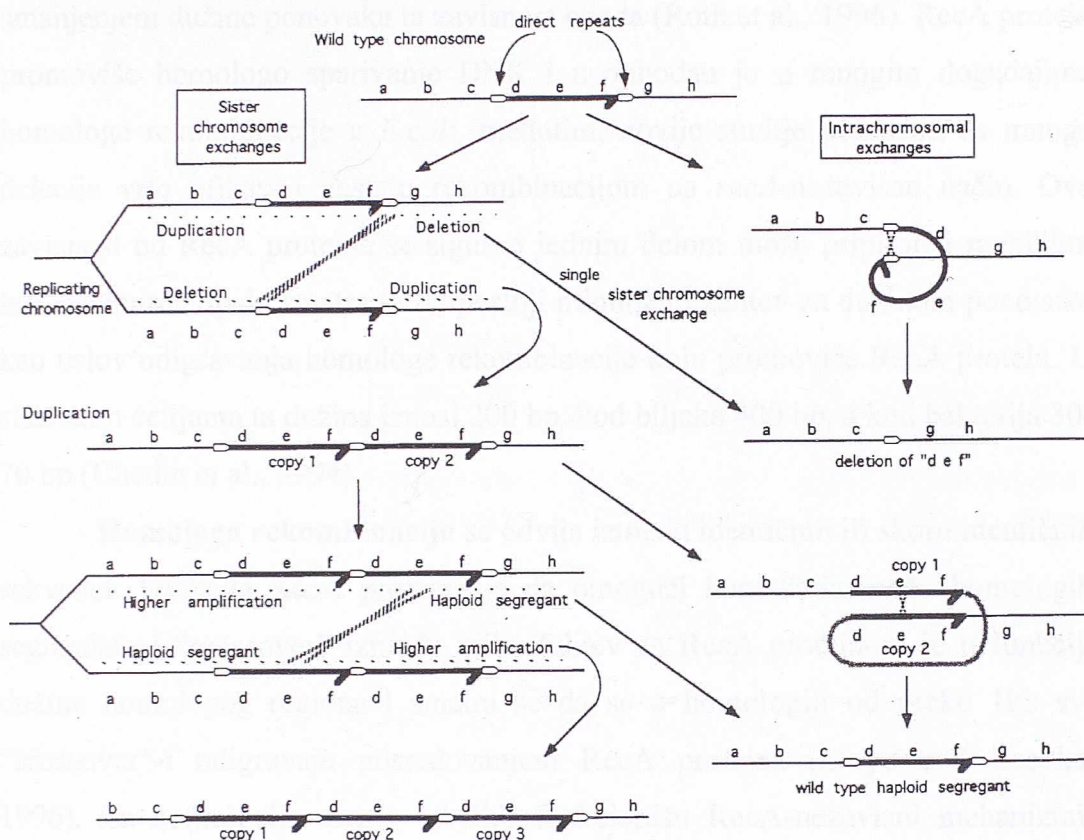
povećanu količinu genskog produkta), dok kod inverzija invertovani fragment DNK može dovesti do promene genske ekspresije. Za razliku od duplikacija i inverzija, delecije su uvek ireverzibilne. Duplikacije su veoma često nestabilne i vode u pravcu delecija.

Svi genetički rearanžmani nastaju procesom rekombinacije između repetitivnih sekvenci. Genetička rekombinacija je fundamentalni proces u ćeliji koji "uobličava" genome svih organizama. Bakterijski rekombinacioni sistemi su izuzetno razvijeni jer su između ostalog neophodni u reparaciji DNK i formiranju adaptivnih hromozomalnih rearanžmana (Roth, 1996), što je za bakteriju od vitalnog značaja. Genetički rearanžmani i proces rekombinacije čine jedan jedinstveni sistem jer u osnovi svih rearanžmana leži rekombinacija, a za studiranje molekularnih mehanizama rekombinacije analiziraju se razni genetički rearanžmani. Rekombinacija poseduje veliku evolutivnu snagu kojom promovira genetičku raznovrsnost s jedne strane i čuva genetički identitet i integritet s druge strane. Možda izgleda kao paradoks, ali posmatrajući na dužoj vremenskoj skali, hromozom predstavlja jednu veoma stabilnu strukturu, dok je na kraćoj vremenskoj skali veoma dinamičan.

Rekombinacioni događaji mogu nastati unutar istog hromozoma (intrahromozomalni) ili između sestrinskih hromozoma (interhromozomalni), slika 2.

Repetitivne sekvence, čije je postojanje osnovni zahtev da bi se rekombinacioni događaj odigrao i doveo do izvesnog rearanžmana na hromozomu, nalaze se u raznim kontekstima na hromozomu *E.coli*. To mogu biti strukturni geni, razni mobilni i pomoćni elementi (IS, Tn, Rhs elementi), razni motivi ili duplikacije gena (Bachelier et al., 1996). Rekombinacioni događaji koji promovišu delecije i inverzije su u suštini isti: delecije se formiraju rekombinacijom između repetitivnih sekvenci istog smera, dok inverzije nastaju rekombinacijom repetitivnih sekvenci suprotnih smerova.

Rekombinacija između repetitivnih sekvenci u velikoj meri doprinosi plastičnosti genoma i njegovoj dinamici. Dužina repetitivnih sekvenci, stepen njihove homologije kao i rastojanje između njih predstavljaju fizičke parametre



Slika 2. Formiranje delecija i duplikacija rekombinacijom između repetitivnih sekvenci (Roth et al., 1996)

koji određuju tip i frekvencu rekombinacije. Međutim, veliki efekat na frekvencu delecija ima i sama priroda lokalne sekvence (Roth et al., 1996).

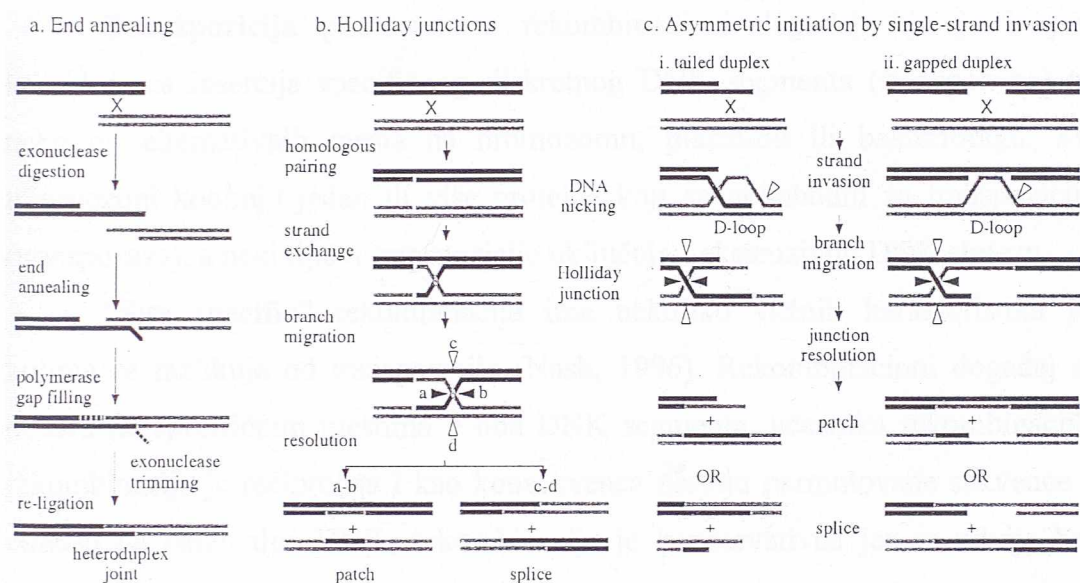
Velike delecije mogu nastati raznim putevima rekombinacije, ali bez obzira na tip rekombinacije, ključni događaj koji vodi formiranju delecija je kontakt između direktnih ponovaka (Chedin et al., 1994). Efikasnost tog kontakta može biti ograničavajući korak za frekvencu nastajanja delecija. Frekvencija delecija opada sa porastom rastojanja između ponovaka jer se na taj način smanjuje mogućnost fizičkog kontakta između njih. Velike delecije spadaju u grupu tzv. ektopičnih rearanžmana koji podrazumevaju rekombinaciju između veoma udaljenih repetitivnih sekvenci, učesnika rekombinacije. Delecije mogu nastati rekombinacijom između dugačkih ili kratkih repetitivnih sekvenci, pa se u tom kontekstu govori o *recA*-zavisnosti velikih delecija. Generalno uzevši, kod dugačkih ponovaka uočena je visoka zavisnost od RecA proteina, dok sa

smanjenjem dužine ponovaka ta zavisnost opada (Roth et al., 1996). RecA protein promoviše homologo sparivanje DNK i neophodan je u mnogim događajima homologe rekombinacije u *E.coli*, međutim, novije studije pokazuju da mnoge delecije vrlo efikasno nastaju rekombinacijom na *recA*-nezavisan način. Ova zavisnost od RecA proteina se sigurno jednim delom može pripisati i različitim test sistemima. Ipak, smatra se da postoji minimalni zahtev za dužinom ponovaka kao uslov odigravanja homologe rekombinacije koju promoviše RecA protein. U sisarskim ćelijama ta dužina iznosi 200 bp, kod biljaka 400 bp, a kod bakterija 30-70 bp (Chedin et al., 1994).

Homologa rekombinacija se odvija između identičnih ili skoro identičnih sekvenci. Funkcija RecA proteina je da omogući kontakt između homologih segmenata i "crossover" između njih. Zahtev za RecA proteinom je u funkciji dužine homologog regiona i smatra se da se u homologiji od preko 1kb svi "crossover"-i odigravaju posredovanjem RecA proteina (Lloyd and Brooks, 1996). Za homologije manje od 1kb funkcionišu RecA-nezavisni mehanizmi. Međutim, to nije isključivo, i evidentno je da postoje "cross"-evi koji su RecA-zavisni, a dužina homologih sekvenci između kojih se odigrava homologa rekombinacija je 23 bp (Lloyd and Brooks, 1996).

RecA-zavisna rekombinacija zahteva ekstenzivnu homologiju između sekvenci pri čemu do rekombinacije može doći u bilo kojoj tački regiona homologije. *RecA*-zavisna rekombinacija se odvija u nekoliko koraka, pri čemu je za inicijaciju neophodno prisustvo jednolančane DNK. RecA protein se vezuje za jednolančanu DNK u obliku spiralnog filameta (Howard-Flanders et al., 1984; Egelman and Yu, 1989) i dovodi do invazije tog regiona (kompleks RecA/jednolančana DNK) u region homologog dupleksa DNK pri čemu se uspostavlja kontakt i formira sinapsa između njih. Tačka spoja ("cross") se pomera duž te sinapse ("branch migration") i formira se heterodupleksni region između homologih sekvenci kao jedna intermedijerna struktura (West, 1994). U poslednjem koraku dolazi do razrešenja ovih heterodupleksa pri čemu se formira rekombinantni produkt. Ovo je vrlo kompleksan proces i postoji nekoliko modela za objašnjenje molekularnih mehanizama među kojima je najpoznatiji Holliday-ev

model (Smith, 1988; Kowalczykowski et al., 1994), slika 3. Nijedan od modela ne daje potpuno zadovoljavajuću sliku što je razumljivo sa aspekta složenosti ovog procesa u enzimološkom, energetskom i mehanicističkom smislu.



Slika 3. Šematski prikaz molekularnih mehanizama formiranja heterodupleksa u homologoj rekombinaciji (Lloyd and Brooks., 1996)

Do danas je identifikovan veliki broj gena čiji produkti učestvuju u procesu homologe rekombinacije (Smith, 1988) i utvrđeno je da postoji nekoliko alternativnih puteva *recA*-zavisne rekombinacije (*recBCD*, *recE*, *recF*). Poznato je da frekvencija *recA*-zavisnih rekombinacija vrlo drastično opada u *recA* mutantima, za 4-5 redova veličine (Lloyd and Brooks, 1996). RecA protein pokazuje preferencijalni afinitet vezivanja za GT bogate regione (Tracy and Kowalczykowski, 1996) u kojima favorizuje rekombinaciju (Tracy et al., 1997). Ovakve sekvence predstavljaju neku vrstu "hot spot"-a u homologoj rekombinaciji i ova saznanja su saglasna sa ranije uočenom činjenicom o postojanju hiper-rekombinogenih regiona u genomu.

Za razliku od homologe (generalne) *recA*-zavisne rekombinacije koja može da se odigra u bilo kojoj tački homologog regiona, postoji i homologa rekombinacija koja je ograničena na mnogo manje homologe regione i odigrava se

u vrlo definisanim sekvencama DNK. Takva rekombinacija je *recA*-nezavisna i grupisana je u dve klase: mesto specifična (“site specific”) i transpozicija. Ove dve klase imaju sličnosti, ali se suštinski razlikuju i njihove genetičke konsekvence su potpuno drugačije (Craig and Kleckner, 1987).

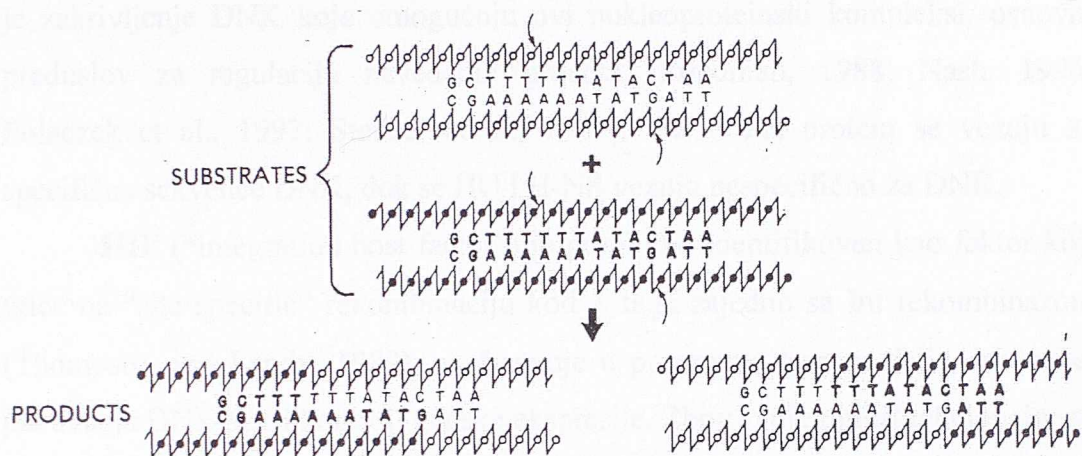
Transpozicija podrazumeva rekombinacioni događaj čija je krajnja konsekvencija insercija specifičnog diskretnog DNK segmenta (transpozona) na neko od alternativnih mesta na hromozomu, plazmidu ili bakteriofagu. Svi transpozoni kodiraju jedan ili više proteina koji su neophodni za transpoziciju (transpozaza), a neki tipovi transpozicije uključuju i ekstenzivnu DNK sintezu.

“**Site specific**” rekombinacija ima nekoliko važnih karakteristika po kojima se razlikuje od transpozicije (Nash, 1996). Rekombinacioni događaj se dešava na specifičnim mestima u oba DNK segmenta, učesnika rekombinacije; rekombinacija je recipročna i kao konsekvencija nastaju permutovane sekvence u odnosu na parentalne DNK; rekombinacija je konzervativna jer se odvija bez sinteze DNK; segmenti rekombinacije oba učesnika su polarni. U oba DNK partnera, nosioca homologih regiona, precizno je određena tačka rekombinacije (internuklearni prekid), ili mesto prekida i spoja. Ovo specifično mesto (funkcionalna “core” sekvenca) koje je osnovni zahtev za “site specific” rekombinaciju, nalazi se na kraćem regionu homologije. Kod najvećeg broja rekombinacionih sistema taj “core” iznosi 20-30 bp rekombinantnog lokusa (Nash, 1996) i obično se na njemu nalaze dva mesta za vezivanje rekombinaznih proteina.

Paradigma “site specific” rekombinacije je svakako integracija i ekscizija λ faga (Craig and Kleckner, 1987). Na primeru λ faga su šematski prikazani supstrati i produkti “site specific” rekombinacije, slika 4. Rekombinacija se odvija između *attP* mesta faga (oko 240 bp) i *attB* mesta bakterijskog hromozoma (oko 25 bp).

Rekombinacija se odvija u nekoliko koraka u kooperaciji “core”-a i rekombinaza. Rekombinaze su specifični proteini koji učestvuju u “site specific” rekombinaciji i one po svojoj specifičnosti sečenja mogu biti integreze, rezolvaze i invertaze. U prvom koraku specifične rekombinaze prepoznaju “core”, u drugom





Slika 4. Šematski prikaz “site specific” rekombinacije
(Craig and Kleckner, 1987)

dolazi do interakcije rekombinaza-DNK i formiranja sinapse, a zatim se enzimskom aktivacijom katalizuje sečenje definisane sekvence DNK. Postoje razni putevi “site specific” rekombinacije koje su razvili razni sistemi (Nash, 1996; Johnson and Simon, 1987), kao npr. *xis*, *res*, *cre*, *hin*, *gin*, λ , P2, P22 i drugi. Veoma važnu ulogu igraju enzimi topoizomeraze i giraze, a mnogi procesi rekombinacije zahtevaju i dodatne proteinske komponente za svoje funkcionisanje, kakvi su IHF, Fis, HU i H-NS. Vezujući se za DNK, ovi proteini stimulišu rekombinaciju pa se ponekad nazivaju rekombinacioni “enhenser”-i. Za navedene proteine izolovani su mutanti, što govori da oni nisu esencijalni za ćeliju (Yasuzawa et al., 1992). Ovi proteini imaju pomoćnu ulogu u procesima “site specific” rekombinacije, replikacije i transkripcije nekih gena (Craig and Nash, 1984).

IHF, Fis, HU i H-NS spadaju u grupu proteina sličnih histonima kod eukariotskih ćelija na osnovu toga što su mali, bazni, sposobni da savijaju DNK menjajući njenu konformaciju i prisutni su u ćeliji u visokim koncentracijama (Schmid, 1990). Ovi proteini igraju važnu ulogu kao komponente visoko-uređenih struktura u kompleksima protein-DNK, odnosno protein-protein-DNK i učestvuju u sinhronizaciji brojnih fizioloških procesa u ćeliji (Better et al., 1982; Craig and Nash, 1984; Friedman, 1988). Kod bakterija su ovakve makromolekulske strukture veoma važne u procesima rekombinacije, replikacije i transkripcije, jer

je zakrivljenje DNK koje omogućuju ovi nukleoproteinski kompleksi, osnovni preduslov za regulaciju navedenih procesa (Friedman, 1988; Nash, 1996; Polaczek et al., 1997; Stenzel et al., 1987). IHF i Fis protein se vezuju za specifične sekvence DNK, dok se HU i H-NS vezuju nespecifično za DNK.

IHF (“integration host factor”) je prvobitno identifikovan kao faktor koji utiče na “site specific” rekombinaciju kod λ faga zajedno sa Int rekombinazom (Thompson and Landy, 1989), a učestvuje u procesima transpozicije, inverzije, pakovanja DNK kao i kontroli genske ekspresije. Zbog svoje multifunkcionalnosti s pravom nosi naziv “protein for all reasons” (Friedman, 1988). Protein čine dve subjedinice - α (11.35 kDa) i β (10.6 kDa) koje su kodirane genima *himA* (38. min.) i *himD* (25. min.). Jedan molekul IHF proteina pokriva region DNK oko 40 bp, a u jednoj polovini tog regiona asimetrično je locirana sekvenca za vezivanje ovog proteina sa konsenzusom od 13 nukleotida – YAANNNNTTGATW (N je bilo koji nukleotid; W je A ili T; Y je A ili G). Ovaj konsenzus je, kako se može videti, prilično varijabilan. Mesto za vezivanje IHF proteina je preferencijalno locirano u AT bogatim regionima (Hales et al., 1994), a posledica formiranja kompleksa IHF/DNK je savijanje DNK za ugao od 160° (Rice et al., 1996), odnosno 180° (Thompson and Landy, 1989). Zakrivljena DNK olakšava interakciju proteina ili domena za vezivanje proteina na DNK koji su udaljeni, a takođe kreira i razne petlje (“loop”) koje dovode u kontakt udaljene segmente. S obzirom na to da se IHF protein vezuje i za repetitivne palindromske ekstragenske elemente (REP ili PU) koje su veoma konzervirane u *E.coli*, *S. typhimurium* i drugim enteričnim bakterijama i koje su dispergovane duž hromozoma, IHF učestvuje u pakovanju i organizovanju arhitekture hromozoma (Boccard and Prentki, 1993; Giladi et al., 1998; Oppenheim et al., 1993), verovatno u kompleksu sa girazama (Oppenheim et al., 1993). Primena moderne tehnologije - UV laser “footprinting” metode, pokazala je da su interakcije između IHF proteina i vezivanja za specifična mesta na DNK identična *in vitro* i *in vivo* (Engelhorn et al., 1995).

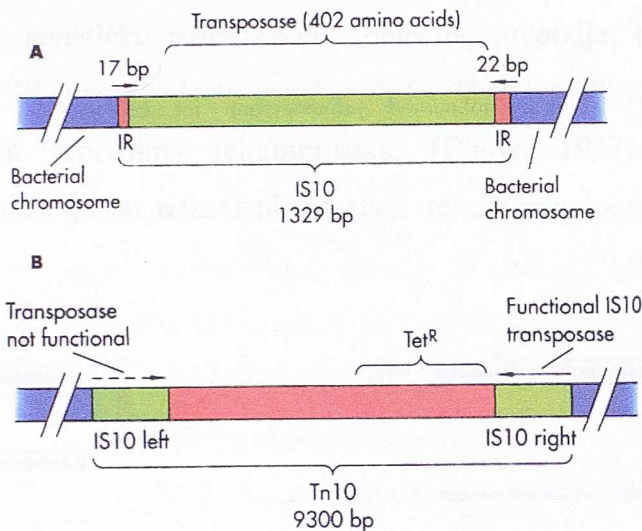
Veoma je interesantno da mnogi genetički elementi koji funkcionišu autonomno kao što su bakteriofagi, transpozoni, IS elementi ili plazmidi, koriste

IHF protein za mnoge svoje aktivnosti (rekombinacija, replikacija, transpozicija), odnosno, u svojim aktivnim domenima imaju mesto za vezivanje IHF proteina (Friedman, 1988).

1.2. INSERCIONE SEKVENCE

Insercione sekvence (IS) pripadaju velikoj grupi mobilnih genetičkih elemenata. Oni su normalni konstituenti hromozoma, plazmida i bakteriofaga, sa velikim kapacitetom da modifikuju gensku ekspresiju i promovišu razne genomske rearanžmane. IS danas predstavljaju bogat izvor eksperimentalnog materijala za studiranje procesa rekombinacije, mutageneze, populacione dinamike i horizontalnog transfera gena, a isto tako predstavljaju moćno oružje u genetičkom mapiranju (Galas and Chandler, 1989). Od otkrića IS elemenata pedesetih godina pa do danas, okarakterisan je veliki broj IS, ali je vrlo mali broj detaljno studiran.

Bakterijske IS su reda veličine od 800-2000 bp. Zastupljene su u više kopija, međutim, njihov broj na plazmidima je mnogo veći (Galas and Chandler, 1989). Igraju veoma važnu ulogu u interakcijama plazmid-hromozom. Pored svoje autentične transpozabilne funkcije, IS predstavljaju izvanredan supstrat za homologu rekombinaciju. IS elementi funkcionišu kao autonomni mobilni elementi, ali isto tako ulaze i u sastav transpozona kao složenih mobilnih elemenata, slika 5. Tipičnu konfiguraciju IS elemenata čine invertovani krajevi između kojih se nalazi kodirajući region. U sastavu transpozona, identične IS su locirane na krajevima transpozona u istoj ili obrnutoj orijentaciji, dok se između njih obično nalazi kodirajući region odgovoran za antibiotsku rezistanciju ili neke kataboličke funkcije (Galas and Chandler, 1989). Transpozoni kao složeni entiteti takođe mogu biti supstrat u homologoj rekombinaciji.



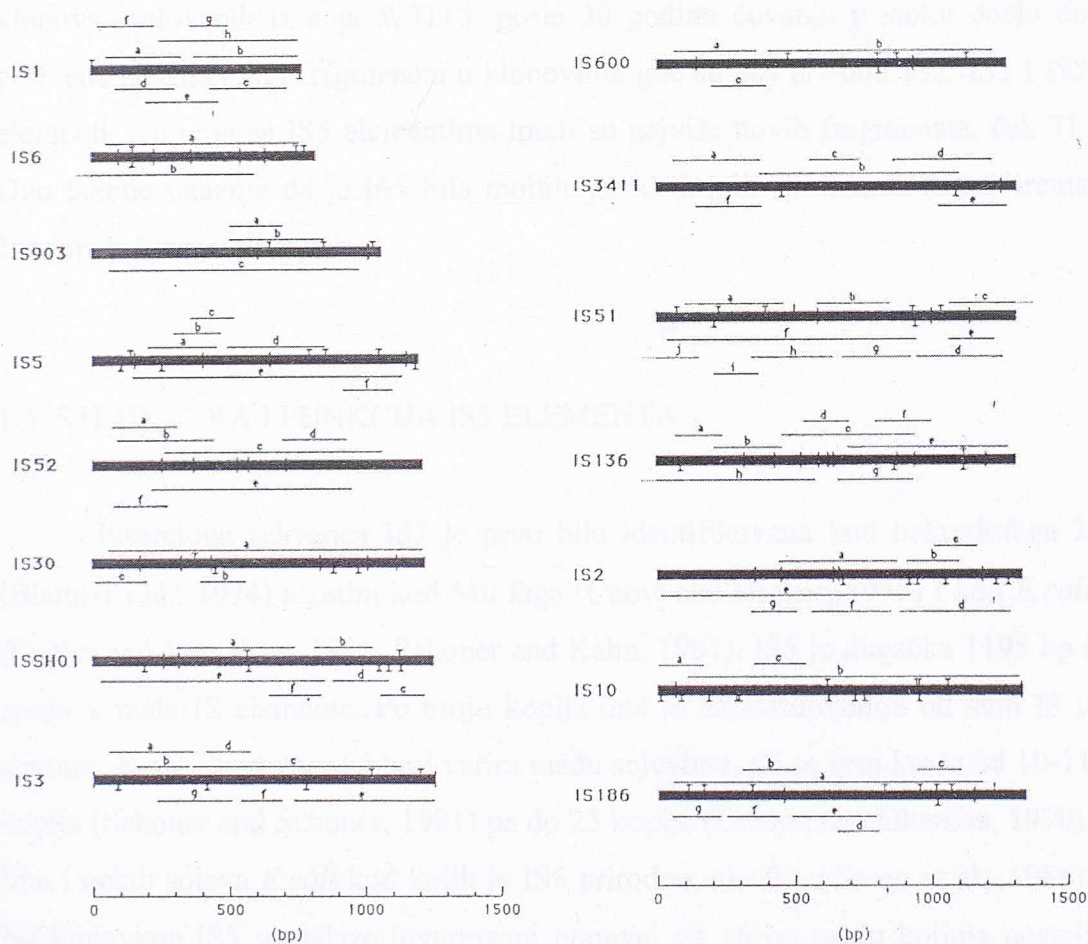
Slika 5. IS element kao autonomna jedinica (A) i u sastavu transpozona (B)
(Watson et al., 1992)

Između invertovanih krajeva IS elemenata koji mogu biti savršene homologije ili sa nekim “mismatch” nukleotidom, nalazi se kodirajući region. Većina IS elemenata ima jedan dugački ORF koji kodira protein transpozazu, i set od nekoliko manjih ORF-ova različitih dužina. O proteinima kodiranim sa IS elemenata se veoma malo zna (Galas and Chandler, 1989), ali se veruje da oni učestvuju u mnogim interakcijama DNK-protein i protein-protein u procesima posredovanim ovim elementima. Na osnovu brojnih eksperimenata *in vitro* izgleda da u procesima transpozicije i ekscizije važnu ulogu ima interakcija nekih proteina IS sa DNA girazom, IHF proteinom, Dam metilazom, DnaA proteinom i DNK polimerazom I (Galas and Chandler, 1989).

Na slici 6 su prikazani IS elementi sa potencijalnim mestima za vezivanje nekih “host” proteina koji učestvuju u regulaciji aktivnosti ovih elemenata. Označena mesta su data na osnovu kompjuterske analize poznatih sekvenci IS elemenata i konsenzus sekvenci za vezivanje IHF proteina i Dam metilaze.

Insercione sekvence kao jedna kategorija autonomnih repetitivnih sekvenci u genomu bakterija imaju velike implikacije na strukturu i stabilnost genoma i njegovu dinamiku. U procesu mutagenoze ovi elementi deluju kao neka vrsta “mutagenih agenasa” (Nevers and Seadler, 1977) koji posreduju u mnogim

mutacionim događajima. Kao diskretni elementi definisane orijentacije, IS promoviraju razne genetičke rearanžmane (delecije, inverzije, transpozicije) pri čemu terminusi IS veoma često predstavljaju “hot spot” u raznim inter i intramolekularnim procesima rekombinacije (Chow, 1977). Svi pomenuti događaji rekombinacije su nezavisni od *recA* rekombinacionog sistema *E.coli* (Chow, 1977).



Slika 6. IS elementi sa označenim mestima za vezivanje IHF proteina i Dam metilaze (⊥= IHF mesto; | = Dam mesto; a,b,c...= ORFs) (Galas and Chandler, 1989)

Broj kopija različitih IS varira (Galas and Chandler, 1989) između laboratorijskih sojeva i prirodnih izolata (ECOR), i među raspoloživim podacima evidentno je da najveću varijabilnost u broju kopija pokazuje IS1, koji je ujedno i najmanji poznati IS (768 bp). Zanimljiv je podatak o broju kopija IS5. Broj kopija IS5 bio je određen u jednom setu od 25 *E.coli* sojeva uzetom iz kolekcije Murray,

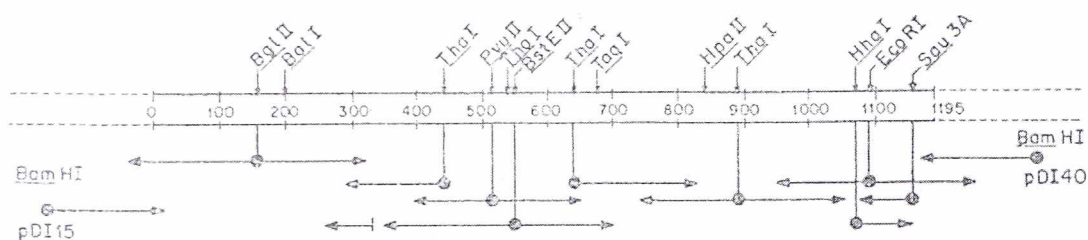
koja je sačinjena između 1917. i 1954. godine (tzv. “preantibiotska era”) (Datta and Hughes, 1983). U poređenju sa brojem kopija IS5 dobijenim iz ECOR kolekcije (71 soj nezavisno izolovanih prirodnih izolata), uočen je značajno veći broj kopija IS5 u Murray kolekciji. Znači da je dugim nizom godina u bakterijskim stokovima došlo do akumulacije ovih elemenata što zapravo govori o njihovoj mobilnosti u genomu. Postoji podatak (Naas et al., 1994) da je u kolekciji klonova izolovanih iz soja W3110, posle 30 godina čuvanja u stoku došlo do promene restrikcionih fragmenata u klonovima gde su bili prisutni IS2, IS3 i IS5 elementi. Klonovi sa IS5 elementima imali su najviše novih fragmenata, čak 31. Ovo takođe ukazuje da je IS5 bila mobilnija od drugih IS elemenata za vreme čuvanja bakterijskih sojeva.

1.3. STRUKTURA I FUNKCIJA IS5 ELEMENTA

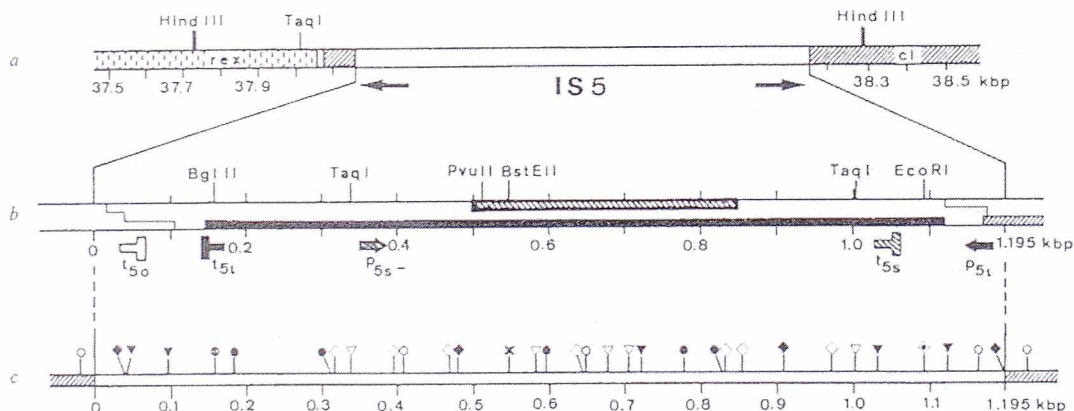
Inserciona sekvenca IS5 je prvo bila identifikovana kod bakteriofaga λ (Blattner et al., 1974) a zatim kod Mu faga (Chow and Broker, 1978) i kod *E. coli* (Engler and Van Bree, 1981; Schoner and Kahn, 1981). IS5 je dugačka 1195 bp i spada u male IS elemente. Po broju kopija ona je najzastupljenija od svih IS u genomu *E. coli*. Naravno, taj broj varira među sojevima, ali se broj kreće od 10-11 kopija (Schoner and Schoner, 1981) pa do 23 kopije (Umeda and Ohtsubo, 1990). Ima i nekih sojeva *E. coli* kod kojih je IS5 prirodno odsutna (Green et al., 1984). Na krajevima IS5 se nalaze invertovani ponovci od 16 bp među kojima postoji jedan “mismatch” nukleotid na poziciji 13. Na slici 7 je data uprošćena šema IS5 sa restrikcionom mestima, a u prilogu 1 je data kompletna nukleotidna sekvenca IS5.

Kao što se može videti, IS5 ima centralni deo od 940 bp koji leži na restrikcionom fragmentu *BglII/EcoRI*, i dva termina koji se završavaju invertovanim ponovcima. Poznato je da su terminusi IS5 veoma deletogeni (Chow and Broker, 1978) i da stimulišu rekombinaciju susednih segmenata DNK. Veoma je karakteristična i zanimljiva struktura unutrašnjeg kodirajućeg dela IS5 po čemu

se on razlikuje od svih ostalih IS elemenata, a to je njegov "dualni" kodirajući kapacitet (Kroger and Hobom, 1982; Rac et al., 1982), slika 8.



Slika 7. Šema IS5 elementa sa restrikcionim mestima (Schoner and Kahn, 1981)



Slika 8. Struktura unutrašnjeg kodirajućeg dela IS5 elementa (Krogen and Hobom, 1982)

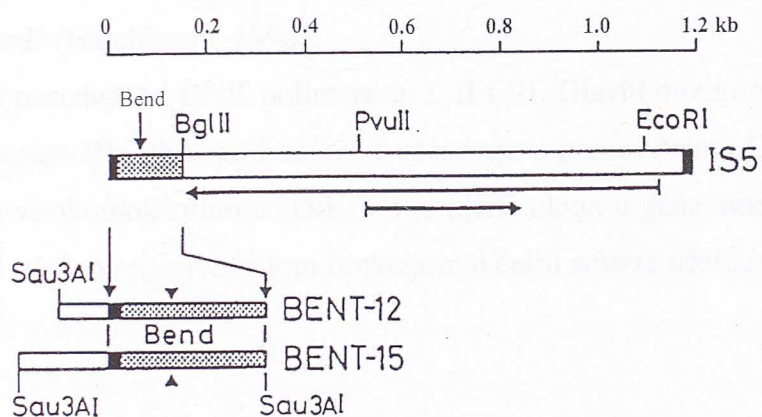
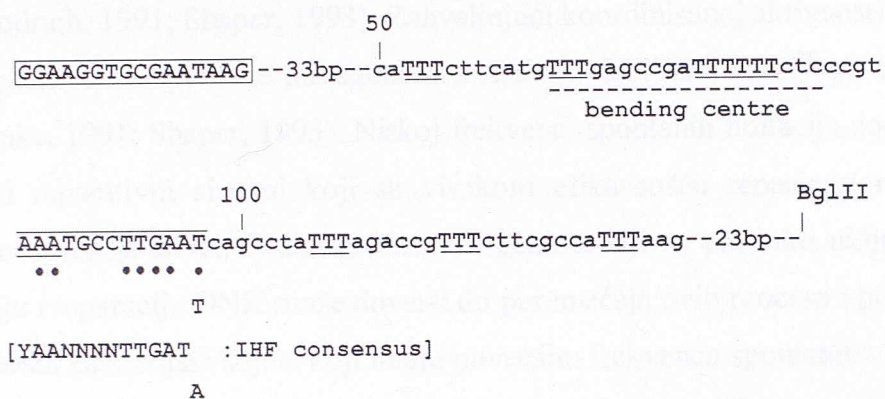
IS5 ima dva ORF-a suprotnih orijentacija koji kodiraju dva proteina, veliki i mali. Veliki ORF se proteže s desna na levo (1127-147 bp) i kodira protein od 326 amino kiselina. Mali ORF je suprotne orijentacije, s leva na desno (525-851bp), i kodira protein od 108 amino kiselina. Kodirajući region malog proteina potpuno pada u okvir kodirajućeg regiona velikog proteina pa zato govorimo o dualnoj proteinskoj ekspresiji. Uloga ovako kompaktne antiparalelne strukture nije poznata, a zasada je jedino pronađena kod IS5 (Rac et al., 1982.). Oba proteina su ekstremno baznog karaktera i veoma su nestabilni. Osim ova dva proteina neobične organizacije, kod IS5 je detektovan i treći protein (Rac, 1984).

IS5 element ima nekoliko funkcionalnih mesta. U levom terminusu postoji konsenzus sekvenca za vezivanje IHF proteina koja je locirana u blizini AT bogatog regiona (Muramatsu et al., 1988). Pored ove, IS5 poseduje i konsenzus sekvenca za vezivanje DnaA proteina i Dam metilaze, i jedini među IS elementima ima mesto vezivanja Fis proteina (faktor stimulacije inverzije) (Galas and Chandler, 1989).

IS5 ima veoma karakterističnu primarnu strukturu levog terminusa koja dovodi do izrazitog zakrivljenja tog dela DNK (sequence directed). Ovo je ustanovljeno prilikom pravljenja banke plazmida koji nose prirodno zakrivljene segmente DNK iz hromozoma *E.coli* (Muramatsu et al., 1988; Mizuno, 1987). Naime, levi terminus IS5, koji obuhvata fragment od leve invertovane sekvenca do *BglIII* mesta (157 bp), sadrži boksove dA/dT nukleotida (>3) koji su približno u fazi DNK heliksa (u proseku na svakih 10.5 bp). Ovakva struktura uzrok je karakterističnog zakrivljenja DNK (bent) koje može imati veoma važnu ulogu u promeni strukture DNK heliksa neophodne za replikaciju, rekombinaciju, transkripciju ili pakovanje (Koo et al., 1986; Ulanofsky and Trifonov, 1987). Na slici 9 prikazana je struktura levog terminusa IS5.

Ovakva struktura pokazuje temperaturnu zavisnost pri kretanju u električnom polju na akrilamidnom gelu (Muramatsu et al., 1988), a poznato je da zakrivljeni segmenti DNK zahtevaju visoke temperature za normalnu migraciju. Na dvodimenzionalnoj elektroforezi ovi fragmenti putuju dijagonalno, što potvrđuje da je zakrivljenost DNK fragmenata uslovljena njihovim nukleotidnim sekvencama. Na slici 9 je obeležen "bending centre" levog terminusa i konsenzus sekvenca za vezivanje IHF proteina.

IS5 je jedan od "najaktivnijih" IS elemenata u genomu *E.coli* i velika je verovatnoća da njegov levi terminus, zahvaljujući opisanoj strukturi, ima važnu ulogu u procesima mutagenaze koji su posredovani ovim elementom.



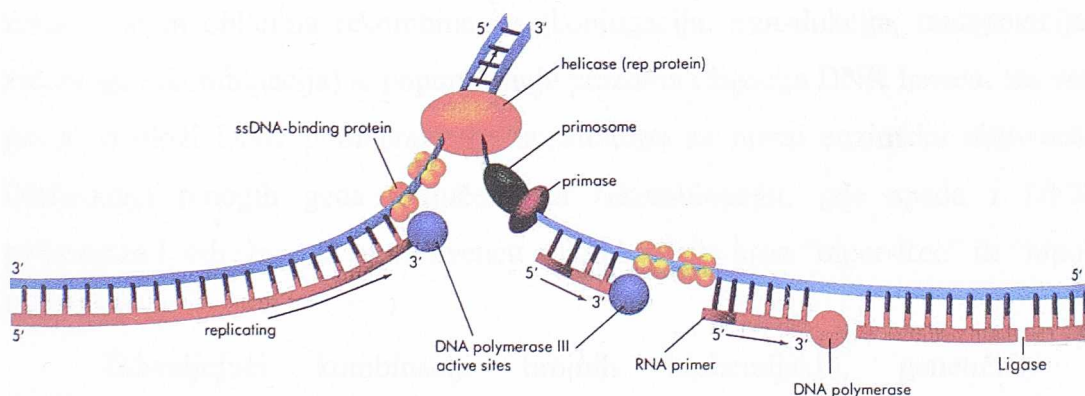
Slika 9. Struktura levog terminusa IS5 elementa
(Muramatsu et al., 1988)

1.4. SPONTANA MUTGENEZA I *polAI* MUTATORSKI SOJ

Održanje genetičkog integriteta vrste i veran prenos informacija zapisanih u molekulu DNK obezbeđeni su pre svega visokim stepenom vernosti replikacije DNK. Replikacija je vrlo složen i precizan proces koji uključuje veliki broj vrlo koordinisanih intracelularnih faktora. Tri velike komponente replikativnog kompleksa (Hatchinson, 1996) koje determinišu tačnost replikacije su sposobnost DNK polimeraza za selekciju adekvatnih baza, 3'-5' egzonukleazna (editorska) funkcija DNK polimeraza i "mismatch" reparativni sistem (Echols and Goodman,

1991; Modrich, 1991; Shaper, 1993). Zahvaljujući koordinisanoj aktivnosti ove tri funkcije, frekvencija spontane mutagenoze u *E. coli* iznosi oko 6×10^{-10} po baznom paru (Drake, 1991; Shaper, 1993). Niskoj frekvenciji spontanijh mutacija doprinose i različiti reparativni sistemi koji sa visokom efikasnošću repariraju različita spontana oštećenja DNK. Svaka promena u genima čiji su produkti uključeni u replikaciju i reparaciju DNK može dovesti do poremećaja ovih procesa i povećane mutabilnosti. Bakterijski sojevi koji imaju povećanu frekvenciju spontanijh mutacija nazivaju se mutatorskim sojevima. U *E. coli* je identifikovan veći broj mutatorskih gena kao što su geni za DNK polimeraze (*polA*, *polB*), kompleks *mut* gena, *dam*, *uvrD* (Hatchinson, 1996).

E. coli poseduje tri DNK polimeraze, I, II i III. Glavni enzim replikacije je DNK polimeraza III. DNK polimeraza I učestvuje u procesovanju Okazakijevih fragmenata u visokomolekularnu DNK i to je njena uloga u generalnoj replikaciji (slika 10), ali se njenom najvažnijom funkcijom u ćeliji smatra učesće u reparaciji



Slika 10. DNK polimeraza I u procesu replikacije (Watson et al., 1992)

oštećene DNK (Kornberg, 1980; Kornberg, 1982). DNK polimeraza I je polipeptid koji kodira *polA* gen (86.min.) koji ima 928 kodona (Bachman, 1983; Joyce et al., 1982). Enzim ima tri odvojene enzimске aktivnosti: 5'-3' polimeraznu, 3'-5' egzonukleaznu (editorsku) i 5'-3' egzonukleaznu (Lehninger, 1975). Klenov fragment (COOH-terminalni deo enzima) koji nosi 5'-3'

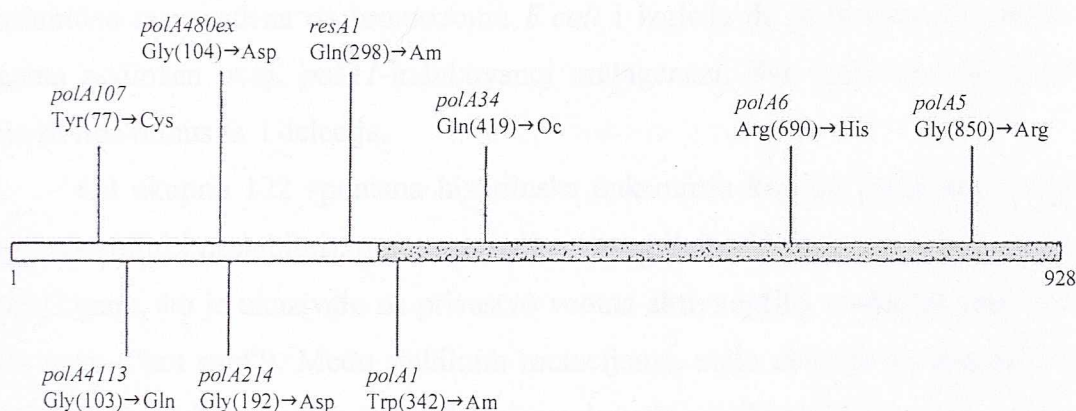
polimeraznu i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost (Brutalgi et al., 1969; Klenow and Henningsen, 1970) može da otpočne polimerizaciju na jednolančanoj DNK u prisustvu prajmera, kao i na dvolančanoj DNK na kojoj su prisutne praznine ("gapped" DNK). DNK polimeraza I je jedina polimeraza koja može da otpočne sintezu na prekidu DNK lanca bez učešća drugih proteina, i upravo ova osobina čini je jednim od najvažnijih enzima u procesu reparacije DNK.

DNK polimeraza I je funkcionalni deo nekoliko enzimskih kompleksa koji učestvuju u reparaciji raznih oštećenja na molekulu DNK kao što su ekscizioni reper (Caron et al., 1985; Cooper and Hanwalt, 1972; Grossman, 1981; Hanwalt et al., 1979; Sancar and Rupp, 198.; Van Houten, 1990; Wahl et al., 1983) i postreplikativni rekombinacioni reper (Barchnecht and Smith, 1978; Jonhson, 1978; Sedwick and Bridges, 1974; Tait et al., 1974; Sharma and Smith, 1987). U SOS indukovanim ćelijama DNK polimeraza I se pojavljuje u vrlo neobičnoj skraćenoj formi (Lackey et al., 1982; Lackey et al., 1985). Kao multifunkcionalni enzim, DNK polimeraza I je uključena i u proces rekombinacije u kome takođe učestvuje veliki broj gena, direktno ili indirektno. Generalno uzevši, poslednji korak u svim oblicima rekombinacije (konjugacija, transdukcija, transpozicija, homologa rekombinacija) je popunjavanje praznina i ligacija DNK lanaca, što već govori o ulozi DNK polimeraze I i supstratima za njenu enzimsku aktivnost. Disfunkcija mnogih gena uključenih u rekombinaciju, gde spada i DNK polimeraza I, odražava se na frekvencu rekombinacije kroz "hiper-Rec" ili "hipo-Rec" fenotip.

Zahvaljujući kombinaciji brojnih biohemijskih, genetičkih i kristalografskih studija (Brown et al., 1982; Joyce and Steitz, 1987; Olli et al., 1985; Minkley et al., 1984; Derbichire et al., 1988), DNK polimeraza I je veoma dobro okarakterisan enzim. Pitanje da li je DNK polimeraza I od esencijalnog značaja za ćeliju do danas je ostalo bez odgovora (Joyce and Grindley, 1984; Kelly et al., 1977). Poteškoće svakako proističu iz multifunkcionalne prirode samog enzima, ali isto tako i iz međusobnih funkcionalnih odnosa između sve tri polimeraze u *E.coli*. Danas je poznat veliki broj *polA* mutanata sa različitim

nedostacima u jednoj ili više enzimskih funkcija. Većina *polA* mutacija je mapirana i sekvencirana, slika 11.

polA1 mutanti su polimerazni mutanti kod kojih je polimerazna aktivnost drastično smanjena, na samo 0.5-1% u odnosu na normalan nivo aktivnosti (De Lucia and Cairns, 1969), dok im je 5'-3' egzonukleazna aktivnost potpuno normalana. Ovi mutanti nose amber mutaciju na 342. kodonu i pokazuju povećanu



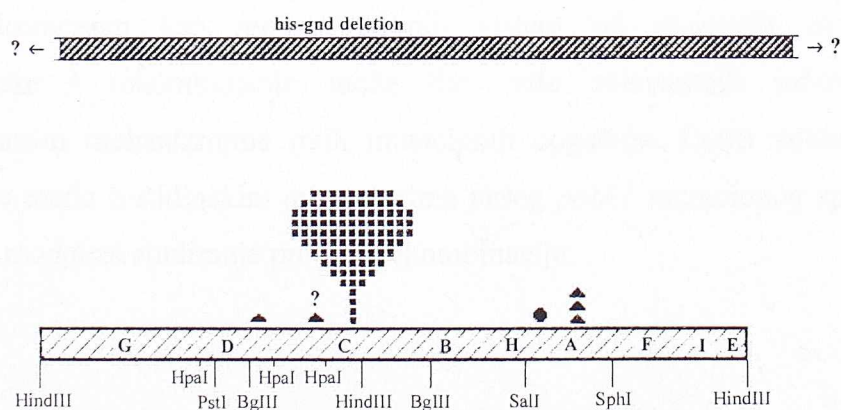
Slika 11. Mapne pozicije nekih *polA* mutacija

senzitivnost na UV i X zračenje, kao i na MMS (metil-metanosulfonat). *polA1* mutanti su vijabilni verovatno zbog toga što nedostatak polimerazne aktivnosti nadoknađuju druge dve polimeraze, ili je za ćelijsku vijabilnost dovoljan mali broj molekula enzima koji je prisutan u ćelijama ovih mutanata. Kao posledica veoma redukovane polimerazne aktivnosti DNK polimeraze I, kod *polA1* mutanata je procesovanje Okazakijevih fragmenata 10 puta sporije u odnosu na divlji soj (Okazaki et al., 1971). Usled toga dolazi do njihovog nagomolavanja i do povećanog prisustva jednolančanih prekida i praznina na molekulu DNK koji duže opstaju u ćeliji. Krajnji efekat ovakvog stanja je povećana frekvencija spontane mutageneze.

Mutatorski efekat *polA1* je potvrđen u nekoliko studija. Te studije su pokazale vrlo blag mutatorski efekat ovog alela praćen na *trp-tonB* regionu hromozoma na kome je uočena povećana frekvencija delecija 5-10 puta (Coukell

and Yanofski, 1970; Siegel and Vaccaro, 1979; Vaccaro and Siegel, 1975), odnosno, na *F'/lacI* sistemu na kome je spektar mutacija bio raznovrstan, a frekvencija mutabilnosti povećana 2.3 puta (Fix et al., 1987). U originalnoj studiji koja je proizašla iz naše laboratorije (Savić and Romac, 1982) u kojoj je mutatorski efekat *polA1* praćen na histidinskom operonu hromozoma *E.coli*, pokazan je veoma snažan mutatorski efekat gde su histidinski auktotrofi bili detektovani u vrlo visokoj frekvenci (10^{-3}). Mutatorska aktivnost *polA1* nije nasumično raspoređena na hromozomu *E.coli* i izgleda da je histidinski operon veoma podložan ovoj, *polA1*-indukovanoj mutagenezi. Sve izolovane mutacije bile su tipa minus *fs* i delecija.

Od ukupno 122 spontana histidinska auktotrofa koji su podeljeni u dve grupe (stabilni i nestabilni), ogromna većina nestabilnih, *fs*⁻ mutanata, mapirala je u *hisC* genu, što je ukazivalo na prisustvo veoma aktivnog(ih) vrućeg(ih) mesta u tom genu ("hot spot"). Među stabilnim mutacijama, male delecije su mapirale u *hisA* i *hisD* genima, dok su četiri delecije pokrivala ceo histidinski operon, slika 12. Kloniranje i sekvenciranje jednog broja mutanata iz ove kolekcije (Janković et al., 1990; Janković, 1990; Kostić, 1990), imali su za cilj upoznavanje primarne strukture mutiranih sekvenci i molekularne osnove njihovog nastajanja.



Slika 12. Mutacioni spektar histidinskih auktotrofa (Janković et al., 1990.)

U skladu sa teorijskom pretpostavkom (Savić et al., 1988), analiza sekvenci u "hot spot"-u pokazala je da u svim mutiranim sekvencama dolazi do

“iskliznuća” jednog kvadropleta 5'-GCTG-3' iz ekstremno monotone sekvence prisutne u *hisC* genu koju čine četiri ovakva konsekutivna kvadropleta (Janković, 1990). Analiza delecija, *hisD* i *hisA*, pokazala je da ovi mutacioni događaji nastaju “proklizavanjem” 18 (*hisD*), odnosno 26 bp (*hisA*) između dva identična pentamera, odnosno dekamera (Kostić, 1990; prilog 2). Ovi rezultati su pokazali da sve mutacije, fs^- i male delecije, nastaju mehanizmom proklizavanja u repetitivnim sekvencama DNK prema modelu Streisinger-a (“slippage” model). Kod *polA1* mutanata tendencija proklizavanja je favorizovana u blizini prekida i praznina na molekulu DNK koji su akumulirani u ovim sojevima.

polA1 mutanti pokazuju povećanu frekvencu rekombinacije koja je prvi put detektovana na *lac* operonu hromozoma *E.coli* (Konrad, 1977). Sličan hiper-Rec fenotip pokazuju i drugi mutanti: *dam*, *lig*, *umuC*, *dnaS*, koji kao i *polA1* akumuliraju jednolančane prekide i praznine na molekulu DNK, čime se povećava broj slobodnih “rekombinogenih” krajeva. Međutim, u procesu konjugacije i transdukcije *polA* mutanti pokazuju drastičan pad frekvence rekombinacije (Zieg et al., 1978), a sličan hipo-Rec fenotip pokazuju i u eksperimentima sa inverzijom λ profaga (Ennis et al., 1987). Ovi kontradiktorni rezultati (hiper-Rec/hipo-Rec) verovatno proizilaze iz razlika u enzimologiji i topološkim zahtevima između linearnih i cirkularnih molekula, odnosno, plazmida, F faktora i hromozoma.

Hromozom kao reprezentativniji sistem od plazmida za praćenje mutageneze i rekombinacije može dati više relevantnih informacija o molekularnim mehanizmima ovih mutacionih događaja. Četiri velike delecije izolovane među histidinskim auktrotrofima našeg *polA1* mutacionog spektra bile su dobar model za studiranje procesa rekombinacije.

CILJ RADA

DA ÓPERAM, NE QUID UMQUAM INVÍTUS FÁCIAS. (*Seneca*)

Potrudi se da nikad ništa ne uradiš protiv svoje volje.

2. CILJ RADA

U mutacionom spektru histidinskih auktotrofa iz *polA1* soja izolovana je posebna kategorija delecija, tzv. velike delecije (*his-gnd*) koje se protežu preko celog histidinskog operona. Na osnovu komplementacione analize, prema kojoj ove delecije prelaze veličinu od 10 kb, pretpostavili smo da one nastaju kao posledica genomskih rearanžmana u regionu histidinskog operona. Postavili smo hipotezu da velike delecije nastaju rekombinacijom između repetitivnih sekvenci koje ograničavaju histidinski operon sa obe strane i da je frekvencija rekombinacije povećana u *polA1* u odnosu na divlji soj.

U analizi molekularnih mehanizama nastajanja velikih delecija i moguće uloge *polA1* alela, imali smo za cilj da definišemo repetitivne sekvence, odredimo njihovu lokaciju, kao i da odredimo dužinu delecija i definišemo novonastalu sekvencu. Na osnovu analize primarne strukture DNK rekombinovane sekvence očekivali smo da ćemo moći da bliže odredimo molekularnu osnovu nastajanja velikih delecija, kao i ulogu *polA1* mutacije u njihovom nastajanju.

MATERIJAL I METODE

DÚLCIA NON NOVIT MÉRUIT, QUI NON GUSTÁVIT AMÁRA. (*Caton*)

Ne zna šta je slatko, ko nije okusio gorke.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. BIOLOŠKI MATERIJAL

Bakterijski sojevi, vektori i bakteriofagi korišćeni u ovom radu dati su u tabelama 1 i 2. Oligonukleotidi za PCR i sekvenciranje dati su u tabeli 3.

Tabela 1. Bakterijski sojevi

Bakterijski soj	Genotip	Referenca/Poreklo
<u><i>E. coli</i> K-12</u>		
MG1655	λ^- , <i>rph-1</i>	CGSC
W3110	λ^- , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rph-1</i>	CGSC
W3110 Thy-	λ^- , <i>thyA36</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rpsD1?</i> , <i>deoC2</i>	CGSC
P3478	λ^- , <i>thyA36</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>polA1</i> , <i>deoC2</i>	CGSC
DY100	W3110 <i>thyA</i> , <i>lacZ118</i> , <i>metE</i> , <i>rpsL</i> , <i>polA1</i> , <i>Azi(Res)</i> , <i>val(Res)</i> , <i>supE42</i>	D. Yungs
SY186	DY100 <i>thyA</i> ⁺	D. Savić
SY266	DY100 Δ (<i>hisGDCBHFIE</i>) <i>gnd</i>	lab. kolekcija
SY268	DY100 Δ (<i>hisGDCBHFIE</i>) <i>gnd</i>	lab. kolekcija
SY270	SY186 Δ (<i>hisGDCBHFIE</i>) <i>gnd</i>	lab. kolekcija
SY272	SY186 Δ (<i>hisGDCBHFIE</i>) <i>gnd</i>	lab. kolekcija
GM33	λ^- , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>dam-3</i> , <i>sup-85</i>	CGSC
GM124	<i>lacZ118</i> , <i>rpsL275</i> , <i>dam-4</i>	CGSC
GM215	λ^- , <i>endA1</i> , <i>dam-3</i> , <i>thi-1</i> , <i>rna-1</i>	CGSC

nastavak table 1.

Bakterijski soj	Genotip	Referenca/poreklo
JM101	<i>F'traD36,proAB,lacI^fZΔM15/supE,thi,Δ(lac-proA)</i>	Messing et al.
NM522	<i>hsdΔ5,Δ(lac-pro), / F', pro⁺,lacI^f,ZΔm15</i>	CGSC
Q358	<i>supF, hsdR, θ80^R</i>	Kohara et al.
JC5519	AB1157 <i>recB21recC22</i>	CGSC
JC9239	AB1157 <i>recF143</i>	CGSC
AB2463	AB1157 <i>recA13</i>	CGSC
KL19-99	<i>λ,recA1, relA1, deoB13, spoT1</i>	CGSC
DH5α	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	CGSC
<u><i>S.typhimurium</i></u>		
TR34	<i>F'Δ(hisHAFIE)2095/ser-821Δ(hisDCBHAFIE)712</i>	P.E.Hartman
TR35	<i>F'his⁺/ser821Δ(hisDCBHAFIE)712 arg-501</i>	P.E.Hartman
TR53	<i>F'hisC2383/ser-821Δ(hisDCBHAFIE)712 arg-5</i>	P.E.Hartman
TR75	<i>F'Δ(hisBH)2405/ser-821Δ(hisDCBHAFIE)712</i>	P.E.Hartman
TR76	<i>F'hisA2406/ser-821Δ(hisDCBHAFIE)712 arg-501</i>	P.E.Hartman
TR78	<i>F'hisF2408/ser-821Δ(DCBHAFIE)712 arg-501</i>	P.E.Hartman
TR79	<i>F'hisI2409/ser-821(ΔDCBHAFIE)712 arg-501</i>	P.E.Hartman
TR84	<i>F'hisE2414ab/ser-821Δ(DCBHAFIE)712 arg-501</i>	P.E.Hartman
TG5701	<i>F'hisG2416/ser-821Δ(hisDCBHAFIE)712 arg-501</i>	P.E.Hartman

CGSC- *E.coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Hawen, Conn.

Tabela 2. Vektori

Vektor	Karakteristike	Referenca/poreklo
pUC18, pUC19	2.69kb, <i>amp^R</i> , <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	Yanisch-Peron et al.1985.
M13mp18, M13mp19	7.25kb, <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	Yanisch-Peron et al.1985.
9B2 (347)	klon EMBL4	Kohara et al. 1987.
3B12 (348)	klon EMBL4	Kohara et al. 1987.
2G4 (349)	klon EMBL4	Kohara et al. 1987.
6D9 (350)	klon EMBL4	Kohara et al. 1987.
21H10 (351)	klon EMBL4	Kohara et al. 1987.
1C5 (352)	klon EMBL4	Kohara et al. 1987.

Tabela 3. Oligonukleotidi za PCR i automatsko sekvenciranje

P1	24 mer	5'- CAGGCTATTGATTCAACGTCAGCG-3'
P2	24mer	5'- TCCCCGACTGGGTCGTGGTTACCC-3'
P3	24mer	5'- CCAGCATAAATGATCCTGCGCACC-3'
P4	24mer	5'- TTTTAGTACATTATGCCTGTTCCG-3'
P5	25mer	5'- CTGTCGCTTGATGATGCGAAATGGG-3'
P6	25mer	5'- AGTCATCGAGCCGTTTTACCCCAAG-3'
P7	25mer	5'- TCATGCCAAAGTGCCACTGATTGCC-3'
P8	25mer	5'- CCATCATTGAGGCACCCAGCTCGAC-3'
P9	25mer	5'- AGCATCTTCCATCGCGCCATCGCTC-3'
P10	25mer	5'- GGCCGAGGTGGATGTGGACTGGCTG-3'
P11	28mer	5'- AATCCAGGCTATTGATTCAACGTCAGCG-3'
P12	25mer	5'- CCGGGGCTGCATTTTCTATTCGAGG-3'
P13	25mer	5'- GATTCAACGTCAGCGACAGATCTGCG-3'
P14	34mer	5'- GGTCAACCACCAAAAAGAAAATACAATACGTCCAG-3'
P15	32mer	5'- CTTCGATTGTCATGATGAGCATAATGTATCGC-3'
P16	30mer	5'- AGTACATTATGCCTGTTCCGAGATGAAGCG-3'
P17	25mer	5'- ACACCAGCCAGGCTAAGCCTCAAGC-3'
P18	34mer	5'- CGAGATGAAGCGAAATCTTTACATGATTATTCCG-3'

Oligonukleotidi od P1 do P4 sintetisani su u kompaniji IDT (Integrated DNA Technologies), Coralville, Iowa, USA.

Oligonukleotidi od P5 do P18 sintetisani su u farmaceutskoj kući Sigma-Genosys Ltd., London, UK.

3.2. MEDIJUMI ZA RAST I ODRŽAVANJE BAKTERIJA I FAGA

Bakterije su kultivisane u tečnom LB medijumu (1% bacto-tripton (10 g/l); 0.5% ekstrakt kvasca (5 g/l); 0.5% NaCl, pH 7.2, (5 g/l)) ili na čvrstoj LA podlozi uz dodatak 1.5% bacto agara (15 g/l). Korišćen je i već pripremljeni LB medijum kuće "PANREAC" (Madrid, Spain) koji se dodaje 32 g/l. Za rast bakterija sa plazmidima u medijume su dodavani odgovarajući antibiotici u sledećim koncentracijama: ampicilin 50-100 µg/ml i tetraciklin 10-20 µg/ml.

Za selekciju i testiranje bakterija korišćen je minimalni medijum MMA (15 g/l bacto-agara; 5 ml/l 40% rastvora glukoze; 1 ml/l 20% rastvora MgSO₄; 0.5 ml/l 1% rastvora vitamina B1; 1xA soli (10.5 g/l K₂HPO₄, 4.5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₂)₂SO₄, 0.42g/l Na-citrata)). Odgovarajuće amino kiseline su dodavane prema ustanovljenoj koncentraciji (Davis et al., 1980). Po potrebi, histidin je dodavan u manjim koncentracijama, tzv. minimalni histidin (0.5 µg/ml). Polučvrsti agar TA7 sadrži: 7 g/l bacto-agara, 10 g/l bacto-triptona i 5 g/l NaCl, i korišćen je u radu sa bakteriofagima.

U radu sa vektorima pUC18 i pUC19 i bakteriofagima M13mp18 i M13mp19 koji sadrže deo laktoznog operona, za detakciju β-galaktozidaze (plavo-bela selekcija) u podlogu su dodavani X-gal (5-bromo-4-hloro-3-indol-β-D-galaktozid) i IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid).

3.3. IZOLOVANJE I MAPIRANJE HISTIDINSKIH AUKSOTROFA

Histidinski auksotrofi su izolovani iz *E.coli* koji nosi mutaciju u genu za DNK polimerazu I. Prekonoćna kultura ovog soja gajena u LB medijumu sa dodatkom timina na 37 °C uz aeraciju je diluirana u fiziološkom rastvoru (0.9% NaCl) i razmazivana na petri šolje sa minimalnom podlogom suplementiranom potrebnim amino kiselinama i minimalnom količinom histidina (0.5 µg/ml). Minimalni histidin ograničava rast histidinskim auksotrofima koji rastu sporo i

daju male providne kolonije. Ove kolonije su purifikovane i testirane na njihovu zavisnost od histidina, a zatim su podvrgnute daljoj komplementacionoj analizi.

Za mapiranje izolovanih histidinskih auktrofa korišćen je set sojeva *S.typhimurium* koji imaju deletiran ceo histidinski operon i nose različite *E.coli* F' epizome sa definisanim mutacijama u histidinskom operonu (Tabela 1). Kao kriterijum za komplementaciju uziman je u obzir samo pun rast – više od 300 kolonija na mestu ukrštanja. Na ovaj način mutacije su locirane u okviru određenih gena *his* operona.

Svi izolovani mutanti su testirani na senzitivnost na UV zračenje kako bi se potvrdilo prisustvo *polA1* mutacije. Doza zračenja je određivana dozimetrom (1 J/m²s), pri čemu su korišćene doze zračenja bile 30, 60 i 90 J/m². Ovako testirani mutanti su čuvani kao permanentni stokovi.

3.4. METODE IZOLOVANJA PLAZMIDNE DNK

3.4.1. Mini metoda (alkalna liza)

Bakterije iz 1.5 ml prekonocne kulture su oborene i resuspendovane u 0.1 ml rastvora I (50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, 4 mg/ml lizozima) i inkubirane na sobnoj temperaturi 5 min. Zatim je dodano 0.2 ml rastvora II (0.2 N NaOH / 1% SDS) i inkubacija je tekla na ledu 5 min. Po dodavanju 0.15 ml hladnog NaAc za precipitaciju proteina reakcija je tekla na ledu još 10 min. Posle centrifugiranja (5 min., 13000 rpm) supernatant je dva puta ekstrahovan smešom fenol-hloroform (1:1). U poslednji supernatant dodano je 2 volumena čistog etanola i DNK je precipitirana 2 min. na sobnoj temperaturi. Talog je ispiran 70% etanolom, a zatim resuspendovan u 20 µl TE pufera sa RNazom (50 µg/ml). (Maniatis et al, 1982).

3.4.2. Izolovanje plazmida na velikoj skali metodom CsCl

Bakterije su bile gajene preko noći u 500 ml LB uz dodatak ampicilina (50-100 µg/ml). Posle centrifugiranja (5000 rpm, 5 min.) talog je resuspendovan u 10 ml 50 mM glukoze, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS, 5 mg/ml lizozima na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 20 ml 0.2 N NaOH / 1% SDS i inkubacija je tekla na ledu. Po dodavanju 15 ml hladnog Na-acetata inkubacija je nastavljena na ledu. Lizat je centrifugiran (18000 rpm, 10 min.) a supernatant je tretiran smešom fenol-hloroform (1:1) radi grube deproteinizacije. Posle centrifugiranja (5000 rpm, 5 min.) DNK iz supernatanta je bila precipitirana dodavanjem dva volumena hladnog etanola (-20 °C). Talog je bio resuspendovan u TE puferu. Na svakih 10 ml ovog rastvora dodavano je po 1 g CsCl, a na svakih 10 ml cezijumskog rastvora dodavano je po 0.8 ml EtBr (10 mg/ml). Posle centrifugiranja (45000 rpm, 36 h, 20 °C), plazmidne trake su identifikovane pod UV svetlom i vađene bočnim bušenjem epruvete pomoću šprica. Uzorak je bio tretiran najpre izoamil-alkoholom radi ekstrakcije EtBr, a zatim je bio dijaliziran u 1 mM EDTA / 10 mM Tris-HCl da bi se DNK oslobodila od CsCl. (Maniatis et al., 1982).

3.5. METODE IZOLOVANJA HROMOZOMALNE DNK

3.5.1. Mini metoda

Ovo je metoda po Hopwood-u za izolovanje DNK iz streptomiceta, modifikovana za *E.coli*. Bakterije iz 5-10 ml prekonoćne kulture (podeljene u 4-6 epruveta po 1.5 ml) su oborene (12000 rpm, 5 min.) i resuspendovane u 500 µl rastvora za lizozim (0.3 M saharoza, 25 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA pH 8) koji sadrži 2 mg/ml lizozima i 50 µg/ml RNase. Inkubacija na 37 °C trajala je 5-10 min., sve dok ćelije nisu postale delimično providne. Zatim je dodano 250 µl 2% SDS i mešano na vorteksu 1 min., dok nije smanjen viskozitet rastvora. U ovaj lizat dodan je jedan volumen fenol-hloroform (1:1), vorteksovano je 30 s i

centrifugirano 2 min. Supernatant je prebačen u čistu epruvetu i ovaj korak je ponovljen dva puta, do gubitka bele interfaze. U supernatant je dodano 1/10 volumena 3 M Na-acetata pH 4.8 i jedan volumen izopropanola, promešano je i centrifugirano 2 min. Supernatant je odliven, talog je rastvoren u 500 μ l TE pufera sa 25 μ l 100 mM spermin-HCl i inkubiran 5 min. na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja, talog je rastvoren u 300 μ l 0.3 M Na-acetat / 10 mM MgCl₂ mešanjem na vorteksu. Zatim je dodano 700 μ l 100% etanola i inkubirano 60 min. na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja supernatant je odstranjen, kao u prethodnom koraku, a talog je rastvoren u 100 μ l TE pufera. Da bi se talog potpuno rastvorio nekad je potrebna i prekonoćna inkubacija. (Hopwood et al., 1985)

3.5.2. Mini metoda – PURAGENE DNA Isolation kit

Bakterije iz 0.5 ml prekonoćne kulture su oborene centrifugiranjem (13-16000 rpm, 5 s) i talog je rastvoren u 300 μ l "Cell Lysis Solution". Resuspendovane ćelije su inkubirane 5 min. na 80 °C do potpune lize. U ćelijski lizat je dodano 1.5 μ l RNase, promućkano i inkubirano 15-60 min. na 37 °C. U lizat je dodano 100 μ l "Protein Precipitation Solution", vorteksovano i centrifugirano 13-16000 rpm, 3 min. Supernatant je prebačen u čistu epruvetu, dodano je 300 μ l 100% izopropanola, izmešano je i ponovo centrifugirano 1 min. DNK se videla u obliku malog belog taloga. Talog je ispran sa 300 μ l 70% etanola, centrifugiran i osušen na sobnoj temperaturi. Talog je zatim rastvoren u 50 μ l DNA "Hydratation Solution", rehidratisan inkubiranjem 1 sat na 65 °C, a zatim preko noći na sobnoj temperaturi.

3.5.3. Izolovanje hromozomalne DNK na velikoj skali metodom CsCl

Bakterije su bile gajene preko noći u 250 ml LB sa dodatkom timina (10 µg/ml). Zatim su centrifugirane (5000 rpm, 5 min.) i talog je resuspendovan u 20 ml 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.1 M NaCl (pH 8). Posle drugog centrifugiranja talog je bio resuspendovan u 4 ml 25% saharoze i 50 mM Tris-a (pH 8). Uz dodatak 40 mg lizozima, 40 mg pronaze i 4 ml 20% SDS-a, ovaj rastvor je inkubiran na 37 °C, a zatim na 65 °C do potpune ćelijske lize, tj. do potpunog razbistravanja rastvora. Deproteinizacija je vršena dodavanjem 5 ml smeše fenol-hloroform (1:1) najmanje dva puta. Ta smeša je centrifugirana (20000 rpm, 15 min.), a iz supernatanta je izolovana DNK u gradijentu CsCl. CsCl je dodavan po formuli:

$$1.23 \times \text{vol} = \text{gr CsCl.}$$

Dobijeni preparat je centrifugiran 36 sati na 36000 rpm na temperaturi 5 °C. Viskozna DNK je hvatana u frakcijama na dnu probušene epruvete, a zatim dijalizirana u 1 mM EDTA i 10 mM Tris-HCl da bi se oslobodila od CsCl. (S.D.Ehrlich, lično saopštenje)

3.6. METODE RADA SA BAKTERIOFAGIMA

3.6.1. Umnožavanje λ faga i izolovanje fagne DNK

U radu je korišćen vektor EMBL 4, predstavnik serije supstitucionih λ vektora (Sambrook et al., 1989). Klonovi EMBL 4 vektora su narastani na soju *E.coli* Q358. Po određivanju titra faga, bakterijska kultura je inficirana fagima tako da je multiplicitet infekcije bio 1:100. 5 ml prekonoćne kulture inficirane fagima inokulisano je u 1 litar LB medijuma koji sadrži 5 mM MgSO₄ i kultura je rasla na 37 °C uz aeraciju do potpune lize (5-7 h). Centrifugiranjem 10 min. na 8000 rpm oboreni su ostaci liziranih bakterija, dok su u supernatantu ostali fagi iz kojih je zatim izolovana DNK.

U supernatant su dodavani DNK-za i RNK-za u koncentraciji od 1 µg/ml, zatim NaCl (do 2%) i PEG 8000 (do 8%). U ovom rastvoru fagi su taloženi preko noći na 0 °C. Posle centrifugiranja (7000 rpm, 5 min.) talog sa fagima je resuspendovan u SM puferu (5 M NaCl, 1 M MgSO₄, 1 M Tris pH 7.6, 2% gelatin) i na svaki ml SM pufera dodavano je 0.71 mg CsCl. Posle centrifugiranja (V_{ti} 50, 45000 rpm, najmanje 8 sati) fagi koji su se koncentrisali na određenoj flotacionoj gustini, izolovani su bočnim bušenjem epruvete. Fagi se vide kao plava traka. Ovako izolovani fagi su prečišćeni još jednom na potpuno isti način. U poslednjem koraku fagi su dijalizirani u 1 mM Tris-HCl / 10 mM EDTA, a zatim je fagna DNK izolovana fenolnom ekstrakcijom i taložena Na-acetatom i hladnim etanolom ili izopropanolom.

3.6.2. Umnožavanje faga M13 i izolovanje DNK

M13 je jednolančani DNK fag u koji je metodama genetičkog inženjerstva insertiran polilinker i deo laktoznog operona (prilog 6). Za vreme intracelularnog rasta jednolančana fagna DNK prolazi kroz dvolančanu replikativnu formu (RF) sa koje se sintetiše jednolančana DNK faga. M13 ne lizira ćeliju domaćina: zreli fagi izlaze u medijum, dok RF forma DNK ostaje u bakterijskoj ćeliji. RF forma se koristi za sve manipulacije sa dvolančanom DNK, dok se jednolančana forma koristi za sekvenciranje nepoznatog fragmenta DNK kloniranog u polilinkeru.

Kompetentne ćelije JM101 su bile transformisane vektorom M13 (RF formom). Transformaciona smeša je bila pomešana sa svežom kulturom ćelija JM101 i top-agarom uz dodatak X-gal/IPTG i razmazovana na LA podlogu. Diskriminacija faga sa i bez inserta zasnivala se na plavo-beloj selekciji plaka. 5 ml bakterijske kulture JM101 je inficirano fagima iz odabrane plake. Posle 4-5 sati rasta na temperaturi od 37 °C i uz laganu aeraciju, ova kultura je bila centrifugirana. U supernatantu su ostali zreli fagi, dok su u talogu ostale bakterijske ćelije sa dvolančanom formom faga (RF). RF forma faga je izolovana iz ovog taloga već opisanom mini metodom za izolovanje plazmidne DNK (Maniatis et al., 1982). Zreli fagi iz 1 ml supernatanta bili su istaloženi dodavanjem

0.2 ml 20% PEG / 2.5M NaCl. Posle centrifugiranja fagni talog je bio resuspendovan u 0.1 ml TE pufera. Zatim je dodano 50 μ l fenola, vorteksovano i inkubirano 15 min. na sobnoj temperaturi. Posle ponovnog centrifugiranja, fenolna faza je bila odbačena, a DNK iz vodene faze je precipitirana 0.3 M Na-acetatom i hladnim etanolom. Precipitacija je vršena 15 min. na -70 °C. Talog je rastvoren u 20 μ l TE pufera i ovakva DNK je bila korišćena za radioaktivno obeležavanje u reakciji sekvenciranja (1-2 μ g DNK po reakciji).

3.7. PRIPREMA KOMPETENTNIH ĆELIJA

Priprema kompetentnih ćelija *E.coli* rađena je metodom kalcijum-hlorida (Mandal and Higa, 1970) na sledeći način: 1 ml prekonoćne kulture (3×10^9 bakterija / ml) inokulisan je u 20 ml svežeg LB medijuma i kultura je rasla na 37 °C uz aeraciju do logaritamske faze ($O.D._{550} = 0.3$). 2 ml ove kulture inokulisano je u novih 20 ml LB medijuma i kultura je rasla na 37 °C uz aeraciju do $O.D._{550} = 0.2$ za sojeve koji su *recA*⁺ ili $O.D._{550} = 0.5$ za sojeve koji su *recA*⁻. Bakterije su centrifugirane (6000 rpm, 10 min.) i talog je rastvoren u 10 ml hladnog 100 mM CaCl₂. Ćelijska suspenzija sa CaCl₂ je inkubirana na ledu 10 minuta, a zatim su ćelije ponovo centrifugirane (6000 rpm, 10 minuta, +4 °C). Posle drugog centrifugiranja ćelije su resuspendovane u 2 ml hladnog 100 mM CaCl₂ sa 15% glicerolom. Ovako pripremljene kompetentne ćelije su podeljene u alikvote od po 200 μ l i čuvane na temperaturi od -80 °C do korišćenja za transformaciju.

3.8. TRANSFORMACIJA BAKTERIJA

U pripremljene kompetentne ćelije (200 μ l) dodavano je 50-100 ng DNK (ligacione smeše ili čistog plazmida). Smeša je inkubirana na ledu najmanje 30 minuta. U sledećem koraku ćelije su podvrgnute temperaturnom šoku ("heat shock") prebacivanjem ćelija direktno na 42 °C gde su držane 2 minuta. Zatim su ponovo vraćene na led. U ovako tretirane ćelije dodavano je 800 μ l LB, a zatim su inkubirane 1h na 37 °C. U sledećem koraku, pošto smo dodavanjem LB medijuma zapreminu povećali do 2 ml, dodali smo ampicilin (50 μ g/ml). Inkubacija sa ampicilinom je tekla 2-3 h na temperaturi od 37 °C uz blagu aeraciju. Kultura sa transformisanim ćelijama je zatim razmazivana na selektivnu podlogu. Pre dodavanja antibiotika jedan alikvot od 0.1 ml je razmazan na petri šolju sa ampicilinom radi izračunavanja efikasnosti transformacije.

Sledeći ovaj protokol, za efikasnost transformacije dobijane su vrednosti 10^6 - 10^7 transformanata po μ g DNK.

U radu sa M13 vektorima, transformacija soja JM101 je rađena tako što su ćelije posle temperaturnog šoka ponovo vraćene na led gde im je onda dodano 40 μ l X-gal, 40 μ l IPTG i 0.2 ml svežih ćelija JM101 u logaritamskoj fazi rasta. Po dodavanju 2 ml top-agara ova smeša je razmazana na LA petri šolje.

U radu sa vektorima pUC18 i pUC19 i kompetentnim ćelijama NM522 takođe smo koristili sistem X-gal / IPTG za plavo-belu selekciju kao indikaciju na prisustvo fragmenta na plazmidu. Bela boja plake ili kolonije označava prisustvo kloniranog DNK fragmenta, dok plava boja znači njegovo odsustvo.

3.9. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK

3.9.1. Digestija DNK

Digestija DNK vršena je različitim restrikcionim endonukleazama koje funkcionišu u odgovarajućim puferima koji se pripremaju kao 10 x koncentrovani. Korišćeni su enzimi farmaceutske kuće "PHARMACIA" čiji su restrikcioni enzimi napravljeni tako da svi funkcionišu u istom puferu "One-Phor-All Buffer PLUS". U sastav pufera ulaze sledeće komponente: 10 mM Tris-acetat pH 7.5; 50 mM K-acetat; 10 mM Mg-acetat. DNK je inkubirana sa odgovarajućom količinom enzima do potpune digestije na 37 °C.

3.9.2. Ligacija DNK

Za ligiranje lepljivih ili ravnih krajeva DNK molekula korišćen je ligacioni pufer sledećeg sastava: 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 5% PEG 8000. Ovaj pufer se pravi kao 5x koncentrovan, a za pospešivanje efikasnosti ligacije u ligacionu smešu je ponekad dodavan i 1 μl glikogena. DNK fragmenti su bili pomešani u molarnom odnosu 1:1, koncentracija DNK u reakcionoj smeši je bila 50-100 ng, a finalni volumen ligacione smeše je bio 10-15 μl. U ligacionu smešu je dodavana 1 jedinica enzima T4 ligaza i inkubacija je tekla 16 sati na temperaturi od 14-16 °C.

3.10. ELEKTROFOREZA I ELEKTROELUCIJA DNK

3.10.1. Elektroforeza DNK

Identifikacija i razdvajanje fragmenata DNK rađeno je na horizontalnim gelovima od agaroze koncentracije od 0.8-1.5 %. Za pripremu gela i kao pufer za elektroforezu korišćen je Tris-boradni pufer (TBE) koji je pripreman kao 5x koncentrovani (54 g Tris, 27 g borne kiseline i 20 ml 0.5 M EDTA). Jedan litar 1xTBE pufera sadrži: 0.89 M Tris; 0,089 M bornu kiselinu; 0.002 M EDTA i 0.5 µg/ml EtBr. Po završetku elektroforeze gelovi su osvetljavani na iluminatoru, UV svetlošću talasne dužine od 266 nm, i fotografisani kroz narandžasti filter. Najveći broj gelova je fotografisan pomoću specijalne CCD kamere povezane sa kompjuterom.

3.10.2. Elektroforetsko eluiranje

Posle preparativne elektroforeze u cilju dobijanja veće količine željenog fragmenta DNK, fragment je izolovan isecanjem komada gela sa odgovarajućom fluorescentnom trakom pod UV svetlošću od 360 nm. Komadić gela je zatim stavljan u dijalizno crevo sa što manjom zapreminom 1xTBE pufera koje je stavljan u električno polje. Pod dejstvom struje DNK je izlazila iz gela u pufer i lepila se za zid dijaliznog creva. Da bi se DNK ponovo vratila u pufer, menjan je smer struje 1-2 minuta i pufer sa DNK je prebacivan u epruvetu. EtBr je ekstrahovan izoamil-alkoholom (vol/vol), a zatim je DNK precipitirana pomoću 0.3 M Na-acetata i etanola.

3.11. OBELEŽAVANJE DNK PROBE RADIOAKTIVNIM IZOTOPOM

Za radioaktivno obeležavanje DNK proba korišćena je metoda "nick" translacije. Enzim DNK-za I izaziva prekide na jednom lancu DNK; uklanjanje nukleotida sa 5' kraja i dodavanje nukleotida na 3' kraj prekida koje vrši DNK polimeraza I dovodi do pomeranja prekida duž DNK lanca ("nick translation"). Ako se u reakciju pored "hladnih" dNTP (dezoksiribonukleozid trifosfata) stave i dNTP obeleženi sa ^{32}P , onda će DNK polimeraza I i njih ugrađivati u prekide duž DNK lanca što će usloviti dobijanje radioaktivno obeleženih fragmenata DNK.

Reakcija obeležavanja vršena je u ukupnoj zapremini od 12 μl pufera (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 50 mM NaCl) koji sadrži 1 μg DNK probe, po 1 mM hladnih dNTP-a, 1 μl DNK-za I (od razblaženja 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 7 jedinica DNK polimeraze I i 50 μCi α - ^{32}P obeleženih dNTP-a specifičnog aktiviteta 10 mCi/ml. Reakcija je tekla 1h na 15 °C i prekidana je dodavanjem EDTA. DNK je zatim taložena pomoću amonijum-acetata i hladnog etanola u prisustvu 1 μg nosačke tRNK. Uspešnost obeležavanja je proveravana merenjem na gama brojaču (LKB).

3.12. HIBRIDIZACIJA

3.12.1. Prenos DNK sa gela na najlonske membrane

Po završenoj elektroforezi gel je tretiran sa 0.25 M HCl koja vrši depurinizaciju i delimično degraduje DNK. Gel je zatim ispiran u destilovanoj vodi, a onda je vršena denaturacija DNK tako što je gel potapan dva puta po 15 minuta u denaturišući pufer 0.05 M NaCl / 1.5 M NaOH. Za to vreme najlonski filter (Gene Screen) veličine gela bio je potopljen prvo u destilovanoj vodi a zatim u denaturišućem puferu. Listovi filter papira (Whatman 3 mm) takođe su bili potopljeni u denaturišućem puferu, a zatim slagani jedan na drugi (2-3 lista). Na njih je stavljen tretirani gel tako da mu je strana sa DNK bila okrenuta na gore.

Preko gela je stavljena najlonska membrana veličine gela i preko nje još dva navlažena 3 mm papira. Važno je voditi računa o tome da se odstrane svi mehurići vazduha. Preko svega ovoga stavljen je sloj upijajućeg papira debljine oko 10 cm i sve je ravnomerno bilo opterećeno tegom od 1 kg. Transfer DNK je vršen 2 h (za fagnu DNK) ili preko noći (za genomsku DNK).

Po završenom transferu DNK, membrana je skidana i stavljana u rastvor za neutralizaciju (50 mM Na_2HPO_4 , pH 6.5). Neutralizacija je trajala 20 minuta; membrana je zatim sušena 1 h na sobnoj temperaturi. DNK je fiksirana za filter pečenjem 1.5 h na temperaturi od 80 °C, a neposredno po pečenju filter je izložen UV zračenju 2 minuta.

3.12.2. Hibridizacija membrana sa probom

Najlonske membrane sa vezanom DNK su pred hibridizaciju potopljene u destilovanu vodu i prebačene u najlonske kese. Zatim je u iste kese dodan pufer za prehibridizaciju (0.5 M Na_2HPO_4 , pH 7.2; 7% SDS; 1 mM EDTA) i kesa zatopljena. Posle prehibridizacije (68 °C, 10 minuta, na ljuļjajućoj platformi), ovaj pufer je bio zamenjen istim u koji je bila dodana i radioaktivna DNK proba. DNK proba je neposredno pred dodavanje denaturisana sa NaOH. Hibridizacija je vršena preko noći na temperaturi od 68 °C, na ljuļjajućoj platformi.

Po završenoj hibridizaciji membrane su isprane u novom puferu (40 mM Na_2HPO_4 pH 7.2; 1% SDS) zagrejanom na 65 °C. Ovaj pufer je menjan nekoliko puta, sve dok radioaktivnost pufera nije opala do fona. Na ovaj način je odstranjen višak probe koja se nije vezala za filter. Membrane su zatim sušene na sobnoj temperaturi i eksponirane sa filmovima KODAK osetljivim na rendgenske zrake.

3.13. PCR METODOLOGIJA

3.13.1 Standardni PCR

Standardni PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda koja omogućava *in vitro* amplifikaciju određene sekvence DNK zahvaljujući simultanoj 5'-3' ekstenziji oba lanca uz korišćenje komplementarnih prajmera koji ograničavaju željenu sekvencu (Saiki et al., 1988). Ponavljanjem određenog broja ciklusa (denaturacija DNK lanaca, hibridizacija prajmera sa komplementarnim sekvencama i ekstenzija novih lanaca), broj umnoženih DNK molekula se povećava geometrijskom progresijom pri čemu se dobijaju veće količine željenog fragmenta DNK (prilog 8).

Za sve protokole PCR reakcija korišćeni su Taq polimeraza, PCR pufer, MgCl₂ i dNTPs kuće "PERKIN ELMER", dok su prajmeri sintetisani u farmaceutskoj kući "SIGMA-GENOSYS" (London, GB) i kompaniji IDT (Iowa, USA). Inače, oligonukleotidi su dizajnirani prema programu Oligo v.4.0.4 (National Biosciences, USA) i Primer Seelect v.3.01 (DNA Star, USA). Kompletna PCR tehnologija u ovom radu urađena je na PCR mašini "PERKIN ELMER", model 480.

Protokol standardne PCR reakcije je izgledao ovako:

DNK matrica	0.5 µl
PCR pufer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP mix (10x)	5 µl
primer X	0.2 µl
primer Y	0.2 µl
Taq polimeraza (5U)	0.2 µl
H ₂ O	35.9 µl

	50.0 µl

Smeša nukleotida je napravljena tako da je svakog nukleotida u finalnoj koncentraciji bilo 2 mM i to je čuvano kao 10x koncentrovani dNTP "mix". U finalnoj koncentraciji PCR reakcije bilo je 0.2 mM nukleotida, 1.5 mM MgCl₂ i 2 μM prajmera. Taq enzim je dodavan po 1 jedinica, dok je DNK matrica dodavana 10-20 ng po reakciji. Većina PCR reakcija je optimizovana u zapremini od 50 μl, a jedan manji deo u 25 μl sa dvostruko manjom količinom svih komponenti.

Standardni PCR program izgledao je ovako:

- | | | |
|----------|------------|-----------------------------|
| 1) 94 °C | 1 minut | denaturacija |
| 2) 60 °C | 30 sekundi | hibridizacija ("annealing") |
| 3) 72 °C | 1 minut | polimerizacija (ekstenzija) |

30 ciklusa amplifikacije

Program je otpočinjao početnom denaturacijom od 5 minuta na 94 °C, a posle tridesetog ciklusa završavan je finalnom sintezom od 10 minuta na 72 °C. Sve PCR reakcije sa setom oligonukleotida P1, P2, P3, P4 rađene su po ovom protokolu. U PCR reakcijama je korišćena DNK izolovanu raznim metodama koje su opisane u ovom poglavlju.

3.13.2. PCR iz jedne kolonije

PCR iz jedne kolonije je veoma brza i efikasna metoda. Sa petri šolje se pokupi jedna veća kolonija, ubaci u epruveu sa 100 μl mili-Q vode i inkubira 5-10 minuta na 100 °C. Zatim se centrifugira (5 min., 13000 rpm) i supernatant prebaci u drugu epruvetu. U PCR reakciju se direktno stavi 5 μl od tog supernatanta. Ovako dobijeni PCR produkti se mogu koristiti i za automatsko sekvenciranje.

3.13.3. Sekundarni PCR

Sekundarni PCR (PCR'') se koristi u cilju povećanja senzitivnosti PCR metode za detekciju minornih količina nekih molekula DNK koji u prvom PCR-u ne mogu biti detektovani. Međutim, njihovo prisustvo se detektuje u sekundarnoj reakciji PCR-a gde se protokol ponavlja, ali se kao matrica koristi jedan alikvot iz prvog PCR-a (obično 1/50 ili 1/100 deo volumena) i tzv. interni oligonukleotidi koji su u odnosu na oligonukleotide korišćene u prvom PCR-u "pomereni" unutar fragmenta najmanje za 3-4 nukleotida. Sekundarni PCR povećava senzitivnost metode 100-1000 puta, ali je veoma povećana opasnost od kontaminacije i od pojave nespecifičnih PCR produkata. Druga negativna strana sekundarnog PCR-a je ta što nije repetitivan. U ovom radu sekundarni PCR je korišćen za određivanje senzitivnosti naše metode za detekciju delecija u rekonstrukcionom eksperimentu.

3.13.4. Multipleks PCR

Multipleks PCR je jedna varijanta PCR-a kojom se simultano amplifikuje više nezavisnih genomskih "target" sekvenci DNK uz korišćenje nekoliko parova prajmera. U ovom radu metoda multipleks PCR-a je adaptirana i optimizirana za praćenje i kvantifikovanje delecija. S obzirom na kompleksnost ovakve PCR reakcije, u cilju povećanja njene specifičnosti napravljena je jedna komercijalna serija specijalnih pufera od 1 do 10 (MPCR, Maxim Biotech) čiji je sastav potpuno nepoznat. U radu je korišćen pufer broj tri (MPCR, buffer 3) kao najefikasniji u našem PCR sistemu. Pored toga, u ovakvim PCR reakcijama je korišćena i jedna specijalna forma AmpliTaq polimeraze, AmpliTaqGold polimeraza, proizvod kuće "PERKIN ELMER". AmpliTaqGold polimeraza je hemijski modifikovana forma AmpliTaq polimeraze koja je enzimski neaktivna. Enzim se aktivira samo na temperaturi između 94 i 95 °C, tako da se u svakom sledećem ciklusu, sa povećanjem količine PCR produkta, povećava i količina aktiviranog enzima. U protokolu multipleks PCR-a, osim pufera broj tri i

specijalnog enzima AmpliTaqGold polimereaze, korišćen je i DMSO (5%), kako bi senzitivnost i specifičnost PCR reakcije bili maksimalno povećani.

Tipična multipleks PCR reakcija izgledala je ovako:

DNK matrica	5 μ l
DNTP (10x)	2.5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1.0 μ l
PCR pufer br.3 (10x)	2.5 μ l
DMSO	1.0 μ l
Primer 1	0.15 μ l
Primer 2	0.15 μ l
Primer 3	0.15 μ l
Primer 4	0.15 μ l
TaqGold (5U)	1.0 μ l
H ₂ O	11.40 μ l

25.00 μ l

30 ciklusa : 1) 94 °C 1 minut
 2) 69 °C 15 sekundi
 3) 72 °C 45 sekundi

Pre-PCR inkubacija je trajala 10 minuta na 94 °C.

Finalna ekstenzija je trajala 10 minuta na 72 °C.

3.14. SEKVENCIRANJE

3.14.1. Klasična metoda sekvenciranja

Osnovni princip ove metode zasnovan je na činjenici da se ddNTP (2',3'-dideoksi nukleozid trifosfati) ugrađuju u lanac DNK potpuno ravnopravno kao i dNTP, pri čemu se na mestu ugradnje ddNTP-a dalja sinteza lanca prekida (Sanger et al., 1977). U reakciji se koristi jedan radioaktivni nukleotid koji omogućava vizuelizaciju DNK lanca na autoradiografiji.

Sekvenciranje je rađeno na vektorima M13 mp18 i M13 mp19 po protokolu kita za sekvenciranje "PHARMACIA". Klonirani fragment je sekvenciran korišćenjem univerzalnog komercijalnog prajmera – 40. Prvi korak u reakciji sekvenciranja je "annealing" reakcija u kojoj prajmer hibridizuje sa komplementarnom sekvencom na jednolančanoj matrici. Ova smeša (10 µl DNK matrice, 2 µl prajmera, 2 µl pufera) je inkubirana 10 min. na 60 °C i zatim postepeno hlađena do sobne temperature. Drugi korak je reakcija obeležavanja gde je u smešu sa prethodno vezanim prajmerom dodavan radioaktivni nukleotid (α -³⁵S dATP) i enzim T7 DNK polimeraza. Posle inkubacije od 5 min. na sobnoj temperaturi, ova smeša je podeljena u četiri epruvete sa već pripremljenom smešom jednog ddNTP (G, A, T ili C) i ostala tri dNTP-a (po 3 µl smeše u svakoj epruveti). Četiri odvojene reakcije su inkubirane 5 min. na 37 °C. U trećem i poslednjem koraku reakcija je zaustavljena dodavanjem "Stop Solution". U svakoj reakciji dobijena je smeša fragmenata različite dužine. Reakcione smeše su čuvane na –20 °C, a pre nanošenja na gel su denaturisane 2 min. na 80 °C.

Za elektroforezu (aparati i ispravljač LKB) je korišćen 8% akrilamidni gel (20 ml 40% rastvora akrilamida, 42 g uree, 10 ml 10xTBE, voda do 100 ml; 0.8 ml 10% amoniju-persulfata i 40 µl TEMED-a) i 1xTBE. Uslovi elektroforeze su bili sledeći: 1800 V, 60 W, 40 mA, 4 h. Po završenoj elektroforezi gel je sušen jedan sat na temperaturi od 80 °C, a zatim eksponiran preko noći sa filmom KODAK osetljivim na X zrake.

3.14.2. Automatsko sekvenciranje

Automatsko sekvenciranje se takođe zasniva na metodi Sanger-a, s tim što je tehnologija automatskog sekvenciranja i analiza sekvence izmenjena i usavršena. Suštinu ove tehnologije čini upotreba obojenih terminatora (Dye Terminator; četiri boje, za svaki nukleotid po jedna) koji se nalaze na kraju DNK lanca i na osnovu kojih laserski čitač uz pomoć sistema filtera daje grafik sa četiri različite boje – crvena (T), crna (G), zelena (A) i plava (C). Protokol za obeležavanje uzorka se zasniva na PCR metodi. Aparat za automatsko sekvenciranje je povezan sa kompjuterom tako da se ceo proces odvija po određenom programu.

Direktno sekvenciranje PCR produkata je rađeno tehnologijom automatskog sekvenciranja. Korišćen je kit i protokol za automatsko sekvenciranje kuće “PERKIN ELMER”. To je ABI PRISM™ DYE Terminator, Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, koji koristi modifikovan enzim AmpliTaq DNA Polymerase, FS. Ovim kitom mogu se sekvencirati dvolančana DNK, jednolančana DNK i PCR produkti. Kit je specijelno optimiziran za tri tipa aparata kuće “PERKIN ELMER”, među kojima je i tip ABA 373 DNA Sequencer korišćen u ovom radu.

PCR produkti koji su sekvencirani bili su veličine oko 1400 bp. Pre sekvenciranja PCR produkti su bili prečišćeni specijalnim kitom za to – QIAquick PCR Purification Kit. To je protokol gde se koriste specijalne kolonice. Ovako prečišćeni PCR produkti su korišćeni u reakciji sekvenciranja koja takođe ima svoj specifični PCR protokol od 25 ciklusa: 96 °C, 30 s; 50 °C, 15 s; 60 °C, 4 min. Jedino odstupanje od protokola bila je promena temperature “annealing”-a, gde je umesto 50 °C korišćeno 57 °C. Na toj temperaturi je fon iz sistema bio potpuno eliminisan. S obzirom na to da su naši PCR produkti bili dosta dugački, korišćen je po jedan spoljašnji i tri unutrašnja prajmera za svaki lanac DNK. Sve PCR reakcije su rađene u PCR aparatu modela 480 koji proizvodi kuća “PERKIN ELMER”.

Tipičan "mix" za reakciju automatskog sekvenciranja izgledao je ovako:

Terminator Ready Reaction Mix	5 μ l
Template PCR product 10-30 ng/ μ l	3-6 μ l
Primer	3.2 pmole
H ₂ O	x μ l

20 μ l

Za razliku od klasične metode sekvenciranja, ovde se kompletna reakcija odvija u jednoj epruveti. Posle završenih 25 ciklusa PCR-a, obeleženi uzorci su precipitirani dodavanjem 2 μ l 3 M Na-acetata i 50 μ l 95% etanola. Posle inkubacije na ledu od 10 min, uzorci su centrifugirani (13000 rpm, 30 min), isprani 70% etanolom, osušeni i resuspendovani u 4 μ l pufera za elektroforezu. Pre nanošenja na gel uzorci su denaturisani 2 min na 80 °C. Korišćene su srednje i dugačke elektroforeze (36 cm i 48 cm) i akrilamidni gelovi od 6% i 4.8%. Korišćen je 1xTBE pufer i gotova smeša za akrilamidne gelove kuće BRL, u koju su pred razlivanje dodavani amonijum-persulfat (10%) i TEMED.

REZULTATI



PERFORMANCE OF PCR

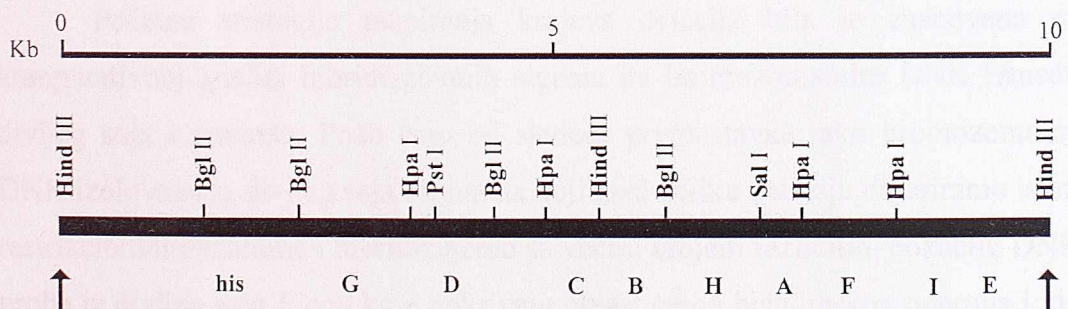
DI SUDÓREM ANTE VIRTÚTEM POSUÉRUNT. (*Hesiod*)

Bogovi su ispred vrline stavili znoj.

4. REZULTATI

4.1. MAPIRANJE HISTIDINSKIH AUKSOTROFA IZOLOVANIH IZ *polA1* SOJEVA

Histidinski operon *E.coli* se nalazi na 44. minutu fizičke mape hromozoma (Berlyn et al., 1996). On leži na dva konsektivna *HindIII* restrikciona fragmenta čija je ukupna dužina 9.8 kb. Veći, proksimalni fragment, iznosi 5.3 kb, dok manji, distalni, iznosi 4.5 kb (Carlomagno et al., 1988), slika 13.



Slika 13. Histidinski operon sa restrikcionim mestima

Histidinski mutanti su izolovani iz DNK polimeraza I – deficijentnih sojeva (*polA1*) i mapirani metodom komplementacije (Savić and Romac, 1982). Odsustvo komplementacije sa bilo kojim od *F'his* plazmida iz seta za komplementacionu analizu (Tabela 1) je pokazalo da se u klasi stabilnih *his*

mutanata delecije pružaju preko celog histidinskog operona. Ova grupa delecija je nazvana velikim delecijama, u skladu sa terminom koji se inače koristi u literaturi ("large deletions"). Dodatna analiza je pokazala da se ove delecije protežu i u sledeći gen, *gnd*, koji se nalazi "udesno" od histidinskog operona i kodira enzim *glukoza-6-fosfat dehidrogenazu* (*his-gnd* delecije). Dakle, prva globalna informacija o velikim delecijama koju smo dobili u početnom skrinovanju mutacija bila je da se krajevi delecija protežu "levo" i "desno" od histidinskog operona i da dužina deletiranog fragmenta iznosi više od 10 kb.

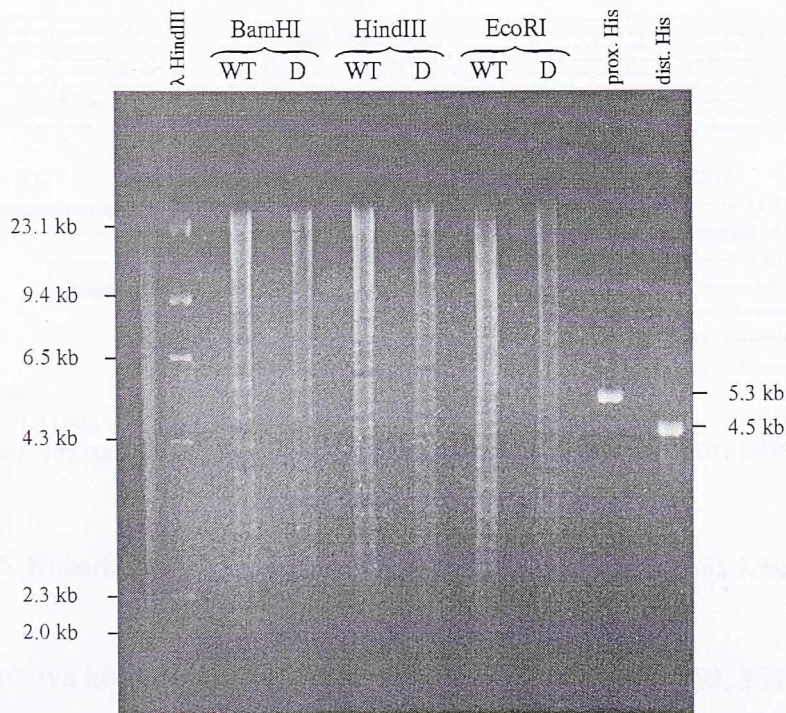
Sve četiri nezavisno izolovane velike delecije su se u eksperimentima mapiranja identično ponašale i naša pretpostavka je bila da su iste. Zato smo odlučili da mapiranje velikih delecija počnemo sa jednom, a zatim, kada dobijemo prve rezultate o eventualnim krajevima delecije, da u dalji rad uključimo i ostale tri. Izolovani deletanti bili su označeni sledećim imenima: SY266, SY268, SY270 i SY272.

4.2. MAPIRANJE KRAJEVA DELECIJE

Početna strategija mapiranja krajeva delecija bila je zasnovana na komparativnoj analizi hibridizacionih signala na hromozomalnim DNK između divljeg soja i mutanta. Pošli smo od sledeće pretpostavke: ako hromozomalnu DNK izolovanu iz divljeg soja i mutanta koji nosi veliku deleciju digeriramo istim restriktionim enzimima i hibridizujemo sa većim brojem različitih, poznatih DNK proba iz divljeg soja *E. coli* koje pokrivaju oblast celog histidinskog operona i idu preko njega u obadva smera, hromozomalna DNK iz divljeg soja će sa svakom probom davati pozitivan signal, dok će DNK iz deletanta davati negativne signale sa svim probama koje pokrivaju region delecije. Ova metoda se naziva "hodanje po hromozomu" ("walking to chromosome"). Probe sa kojima DNK iz deletanta daje prve pozitivne signale levo i desno od histidinskog operona biće od interesa za dalji rad, jer su krajevi delecije sadržani u tim fragmentima DNK. Daljim skraćivanjem tih proba doći ćemo do najmanjeg fragmenta koji daje pozitivan

signal sa hromozomalnom DNK iz deletanta. On će biti kloniran i podvrgnut daljoj analizi. Sama priroda tog fragmenta, odnosno njegova struktura i pozicija u odnosu na divlji soj, određiće dalju strategiju i metodologiju u radu. U hibridizaciji sa DNK probama koje sadrže krajeve delecije treba očekivati različitu sliku restrikcionihi fragmenata između divljeg soja i deletanta, dok probe koje pokrivaju regione iza delecije, levo i desno od nje, i u divljem soju i u deletantu treba da daju istu sliku restrikcionihi fragmenata.

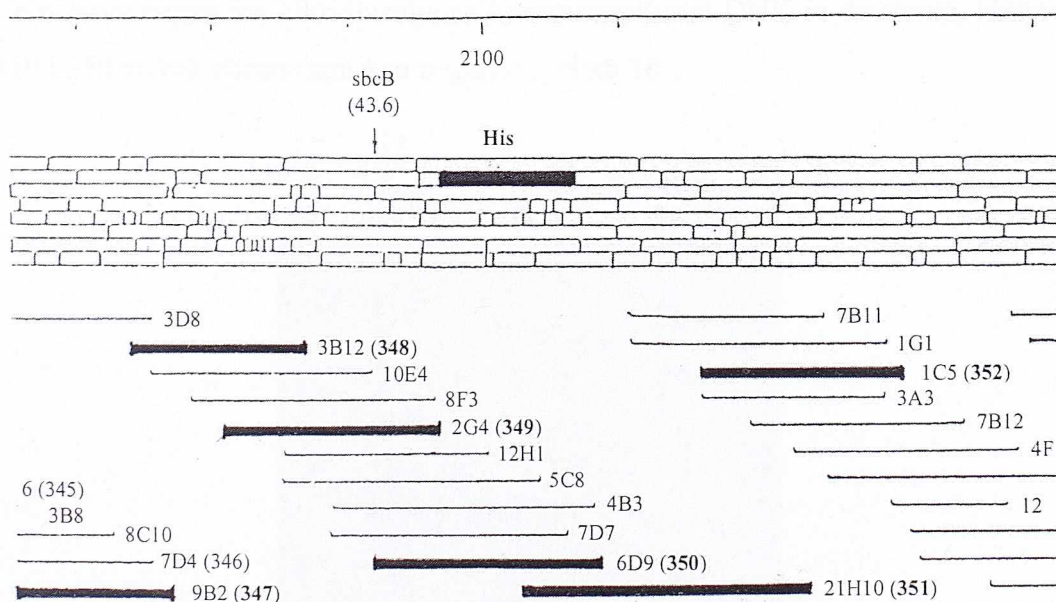
Polazeći od napred navedenih pretpostavki, komparativna analiza između divljeg soja i deletanta metodom “hodanja po hromozomu” je urađena na sledeći način. Kao predstavnika mutanata izabrali smo soj SY266, prvi koji smo izolovali, a kao divlji soj koristili smo DY100, *polA1* soj iz koga je ova velika delecija izolovana. Izolovali smo hromozomalne DNK iz oba soja i uradili totalnu digestiju sa tri različita restrikciona enzima posebno (*BamHI*, *HindIII* i *EcoRI*). Ovako digerirana DNK bila je razdvojena na agaroznom gelu i metodom Southern blotting (Southern, 1975) prenešena na nitrocelulozni filter, slika 14.



Slika 14. Digestije hromozomalnih DNK iz divljeg soja i deletanta (WT-divlji soj; D-deletant)

Zatim je takva DNK bila hibridizovana sa DNK probama obeleženim radioaktivnim fosforom. Kao probe smo koristili jedan set klonova iz Koharine λ biblioteke hromozoma *E.coli* (Kohara et al., 1987). Svaki od šest λ klonova koje smo imali nosio je deo hromozoma *E.coli* veličine između 15 i 20 kb. Klonovi su bili izabrani tako da DNK fragmenti koje oni nose, pokrivaju region celog histidinskog operona i njegovu "levu" i "desnu" stranu ulazeći u gene *gnd* i *sbcB* (43. i 44. minut). Svi λ klonovi su bili preklapajući (prilog 3).

Na slici 15 je prikazana šema jednog segmenta Koharine biblioteke koji obuhvata 43. i 44. minut fizičke mape *E.coli*, na kojoj je označena pozicija histidinskog operona i jednog broja prepokrivaćućih fragmenata koji su klonirani. Na šemi su posebno označeni klonovi i njihovi nazivi koje smo mi koristili u radu, a čija će imena biti korišćena u daljem tekstu.

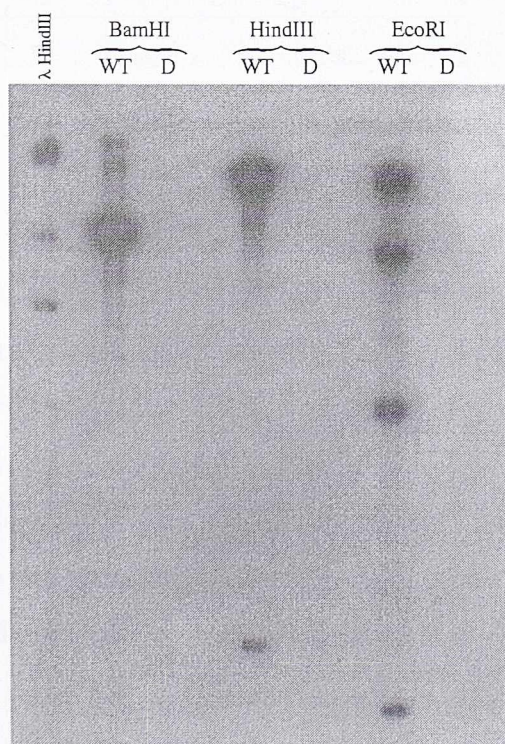


Slika 15. Koharina mapa: pozicija histidinskog operona i korišćenih λ klonova

Svih šest klonova koje smo koristili kao probe (347, 348, 349, 350, 351 i 352) bili su λ vektori tipa EMBL 4 (prilog 4) u čije su restrikciono mesto *EcoRI* klonirani određeni DNK fragmenti. Prvobitna ideja da kao probe koristimo cele λ klonove kako bismo u prvom krugu eliminisali neke od njih na osnovu negativne

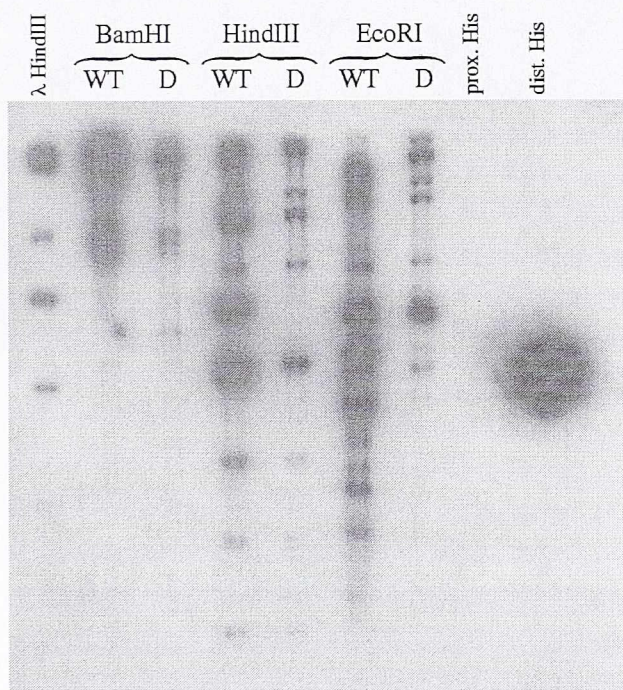
hibridizacije je odbačena, jer je nativni λ fag, bez ikakvog DNK fragmenta iz *E.coli*, davao pozitivne signale u hibridizaciji sa hromozomalnom DNK iz *E.coli*. Zbog toga smo *EcoRI* digestijom odvajali “levu” i “desnu” ruku faga i eluirali samo klonirani materijal. Od toga smo pravili radioaktivne probe: kompletan klonirani fragment sa jednog klona bio je jedna proba. Probe su bile radioaktivno obeležavane “nick”- translacijom. Samo je klon 350 bio obeležen kao jedan veliki fragment, dok su svi ostali klonovi bili smeše od nekoliko fragmenata, što je zavisilo od broja prisutnih restrikcionih mesta *EcoRI* na kloniranom fragmentu. Za prvi krug hibridizacije, za diskriminaciju pozitivnih i negativnih klonova, broj fragmenata nije bio značajan.

Kako se može videti na slici 15, klon 350 pokriva histidinski operon, klonovi 351 i 352 pokrivaju “desnu”, a klonovi 347, 348 i 349 pokrivaju “levu” stranu operona. Rezultati hibridizacije su prikazani na slikama 16, 17, 18, 19 i 20. Na osnovu negativne hibridizacije sa hromozomalnom DNK iz deletanta, klonovi 349 i 350 su bili eliminisani kao negativni, slika 16.



Slika 16. Hibridizacija sa probom 349
*Hibridizacija sa probom 350 daje slične signale

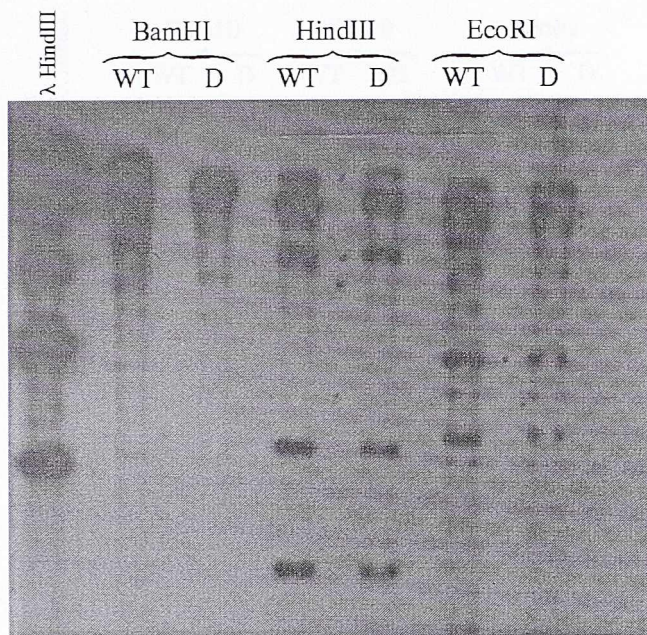
Prvi pozitivan signal s “desne” strane pokazivao je klon 351 koji je davao različitu restrikcionu sliku fragmenata kod divljeg soja i deletanta (slika 17), dok je klon 352 koji sledi iza njega “udesno”, davao pozitivan signal u hibridizaciji i identičnu sliku restrikcionihi fragmenata kod divljeg soja i deletanta (slika 18).



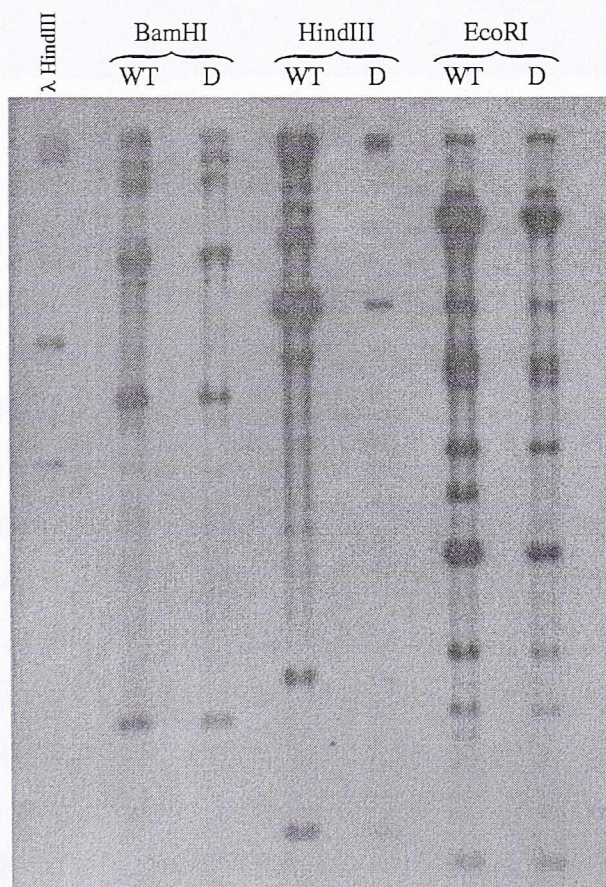
Slika 17. Hibridizacija sa probom 351

Kako klonovi 350, 351 i 352 slede jedan drugog “udesno” i međusobno se preklapaju, na osnovu dobijenih rezultata autoradiografija bilo je jasno da desni kraj delecije nosi klon 351, i to na onom delu fragmenta koji se ne preklapa ni sa jednim od klonova 350 i 352.

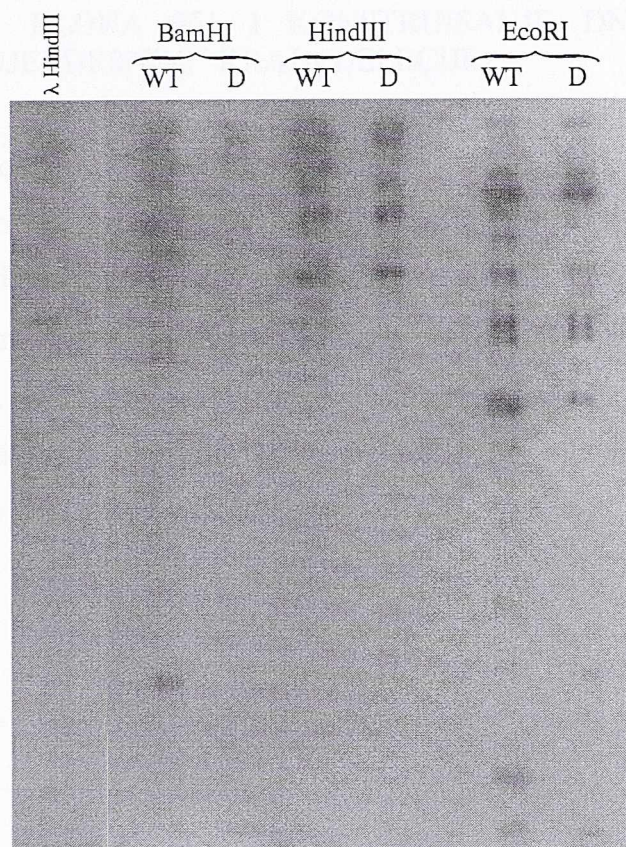
Analizom “levog” kraja videli smo da prvi levi klon od histidinskog operona, 349, pripada deleciji (slika 16), dok klonovi 348 i 347 koji ga slede “ulevo” i preklapaju se, daju pozitivne signale u hibridizaciji, ali oba klona pokazuju različitu sliku restrikcionihi fragmenata između divljeg soja i deletanata (slike 19 i 20).



Slika 18. Hibridizacija sa probom 352



Slika 19. Hibridizacija sa probom 347



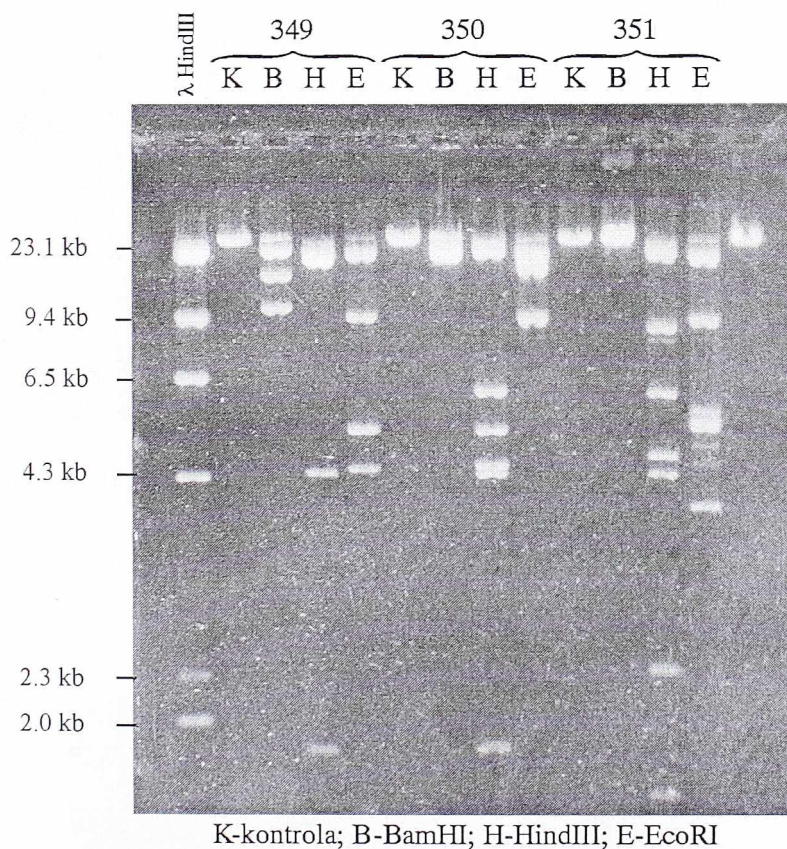
Slika 20. Hibridizacija sa probom 348

Naša pretpostavka je bila da se “levi” kraj delecije nalazi na preklapajućem delu fragmenata koje nose klonovi 347 i 348. Na osnovu Koharine mape i pozicije naših klonova (slika 15) i na osnovu dobijenih rezultata hibridizacije, grubo smo procenili da se veličina delecije kreće između 35 i 40 kb, što se, kako ćemo kasnije videti, ispostavilo ispravnim.

U dalji rad za određivanje krajeva velikih delecija ušli su klonovi 351, 347 i 348. Pozitivni rezultati u hibridizaciji koje su dali ovi klonovi odredili su ih za dalji rad, iako su, s druge strane, njihove slike restrikcionih fragmenata dobijene sa hromozomalnim DNK iz divljeg soja i deletanta bile veoma komplikovane za analizu. Orijentisali smo se prvo na analizu “desnog” kraja delecije, tj. klona 351. Inače, kako će se kasnije videti u ovom radu, klon 351 je bio najvažniji jer nam je pružio važne informacije i rasvetlio mnoge prethodne nejasnoće. Zato će o njemu biti izneseno više detalja.

4.3. ANALIZA KLONA 351 I KONSTRUISANJE DNK PROBA ZA MAPIRANJE "DESNOG" KRAJA DELECIJE

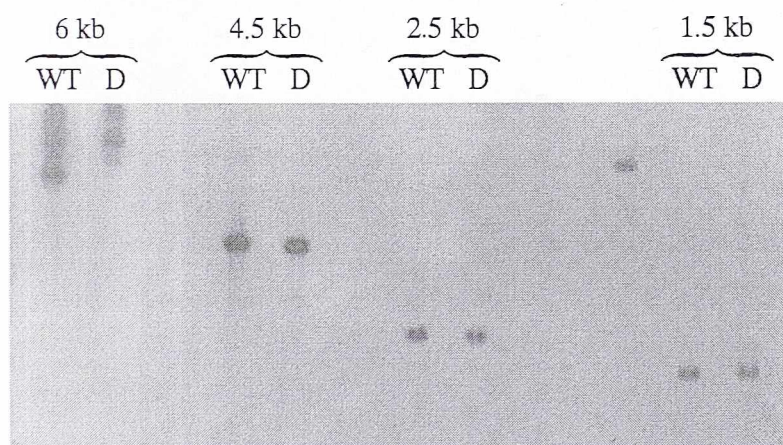
Sledeći korak je podrazumevao pravljenje kraćih DNK proba od fragmenta koji je nosio klon 351, a to je oko 20 kb. Na Koharinoj mapi (Kohara et al., 1987) za svaki klon je data i restrikciona mapa za osam najčešće korišćenih restrikcionih enzima. Međutim, naši rezultati restrikcionog sečenja λ klonova pokazivali su dosta odstupanja od Koharinih koji su bili dosta neprecizni, tako da smo se držali naših restrikcionih mapa. Na slici 21 su prikazane digestije klonova 349, 350 i 351 sa enzimima *BamHI*, *HindIII* i *EcoRI*.



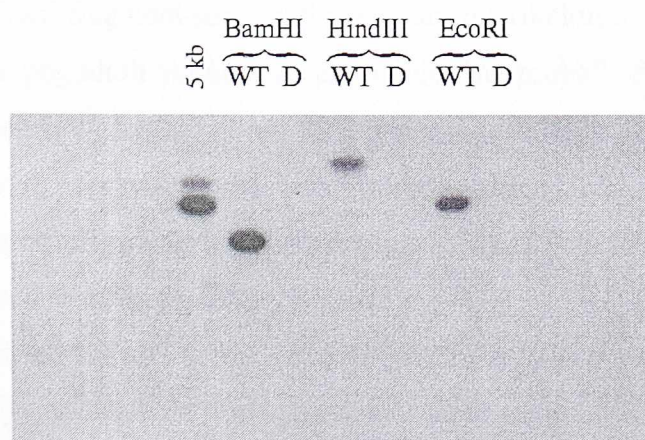
Slika 21. Digestije klonova 349, 350 i 351

Odlučili smo da *HindIII* digestiju klona 351 iskoristimo za pravljenje manjih proba. Eluirali smo četiri *HindIII* fragmenta, dužina: 6 kb, 4.5 kb, 2.5 kb i 1.5 kb (prilikom *HindIII* digestije ovog klona, jedan deo kloniranog fragmenta

dužine od oko 5 kb ostaje vezan za “kraću” ruku faga, prilog 4). Svaki od ovih fragmenata je bio radioaktivno obeležen i korišćen posebno kao proba u hibridizaciji sa hromozomalnim DNK iz divljeg soja i deletanta koje su takođe bile totalno digerirane enzimom *HindIII*. Na slici 22 su predstavljene autoradiografije na kojima se jasno vidi da će u dalju analizu ući samo fragment od 6 kb. Tri manje probe (4.5, 2.5 i 1.5 kb), kako se vidi, daju identične signale i sa divljim sojem i sa deletantom. Naknadna hibridizacija sa fragmentom od 5 kb koji je ostao vezan za “kraću” ruku faga, pokazala je da je ovaj fragment DNK kod mutanta deletiran, slika 23.

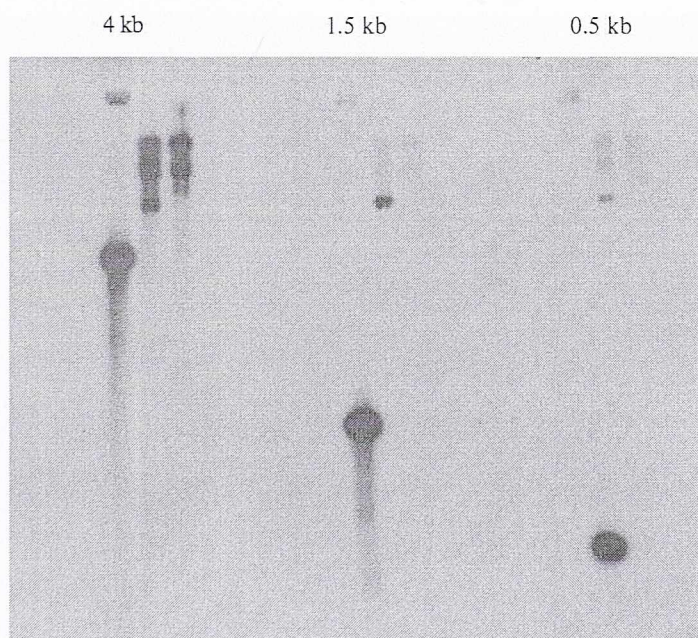


Slika 22. Hibridizacije sa subprobama od 6 kb, 4.5 kb, 2.5 kb i 1.5 kb



Slika 23. Hibridizacija sa subprobom od 5 kb

HindIII fragment od 6 kb je bio kloniran na plazmid pUC18 (prilog 5) s ciljem da se amplifikuje i da se od njega naprave još kraće probe. U sledećem koraku smo ovaj klon isekli enzimima *HindIII/EcoRI* i dobili tri manja fragmenta od 4 kb, 1.5 kb i 0.5 kb (plus linearni plazmid). Na isti način kao u prethodnom koraku, fragmenti od 1.5 kb i 0.5 kb su eliminisani jer su pripadali deletiranom regionu, a fragment *EcoRI* od 4 kb je ušao u dalji rad, slika 24.

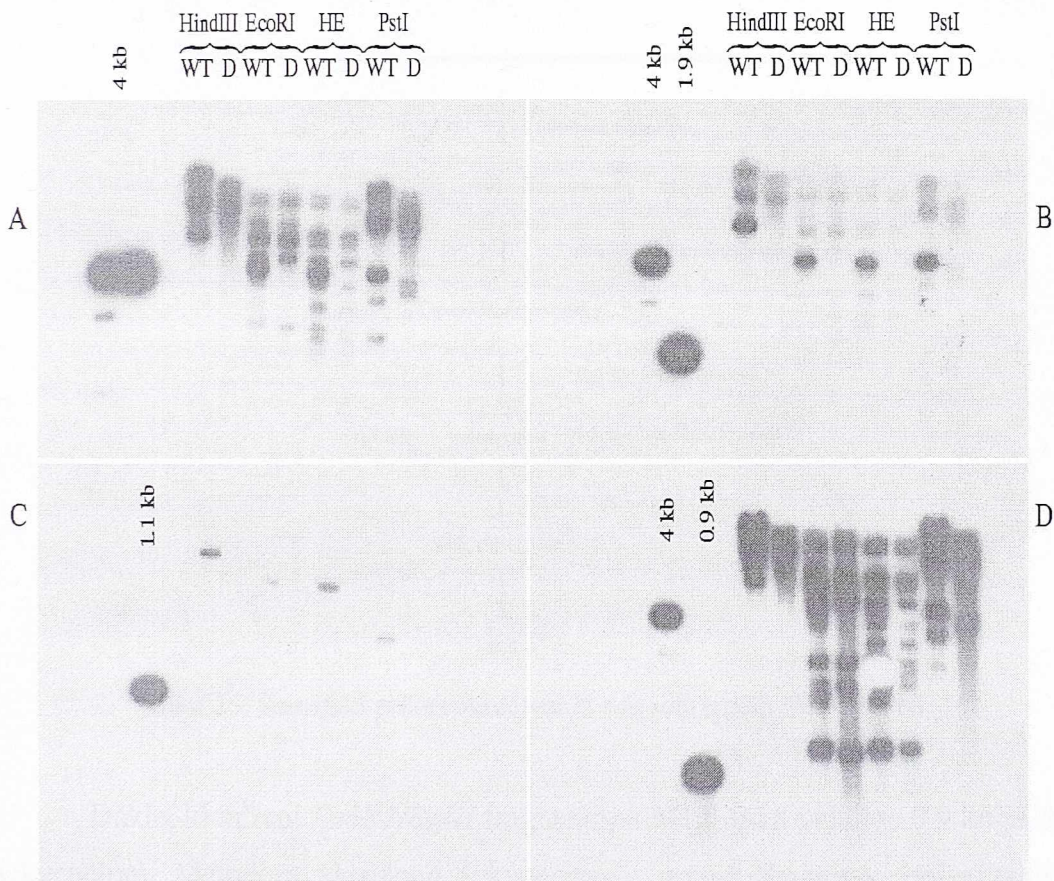


Slika 24. Hibridizacije sa subprobama od 4 kb; 1.5 kb; 0.5 kb

Ovaj eluirani fragment smo sekli različitim restrikcionim enzimima tražeći manje fragmente pogodnih veličina za pravljenje “subproba”. Tako smo duplom digestijom enzimima *BglII/PstI* dobili tri fragmenta približnih veličina 1.9 kb, 1.1 kb i 0.9 kb i od njih napravili nove probe. Hromozomalne DNK iz divljeg soja i iz deletanta smo digerirali sa više različitih enzima – *HindIII*, *EcoRI*, *HindIII/EcoRI* i *PstI* i hibridizovali sa ovim probama, slika 25.

Fragmenti od 1.9 kb i 1.1 kb (*EcoRI/PstI* i *PstI/BglII*) su bili eliminisani jer je hibridizacija pokazala da pripadaju deletiranom regionu. Konačno, proba od 0.9 kb (*EcoRI/BglII*) je bila najmanja koja je davala pozitivan signal u hibridizaciji sa deletantom. Ovaj fragment od 0.9 kb je bio kloniran direktno u

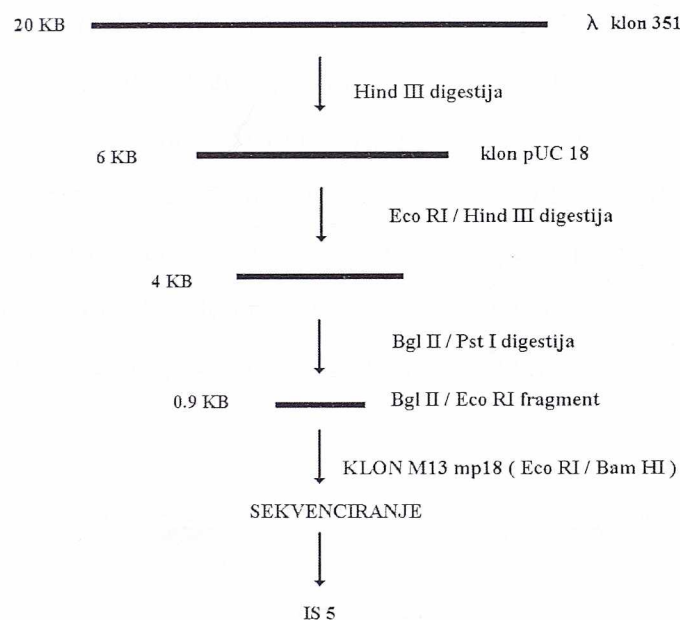
restrikciono mesto *EcoRI/BamH* vektora M13mp18 (*BglIII* i *BamHI* su izošizomeri) kako bi bio sekvenciran (prilog 6). Na slici 26 je šematski prikazan postupak pravljenja odgovarajućih manjih proba na osnovu rezultata hibridizacije, polazeći od početnih 20 kb do subklona od 0.9 kb.



Slika 25. Hibridizacije sa subprobama od 4 kb (A); 1.9 kb (B); 1.1 kb (C); i 0.9 kb (D)

Zanimljivo je, kako se na prikazanim radiografijama može videti, da je slika restrikcionih fragmenata kod divljeg soja i deletanta koju daje ova proba od 0.9 kb veoma slična onoj koju daje cela proba od 4 kb sa koje je ovaj mali fragment subkloniran. Ono što je evidentno u celoj ovoj analizi “hodanja po hromozomu” je da je diskriminacija hibridizacionih signala između deletiranog i nedeletiranog regiona hromozoma uvek bila vrlo jasna, dok je “kritičan” fragment (proba) koji nosi kraj delecije, počevši od 20 kb na početku analize pa sve do

najmanje probe od 0.9 kb, uvek davao veoma složenu i komplikovanu ali istovremeno i intrigirajuću sliku. Jedina informacija koja je proizlazila iz serije prikazanih hibridizacija bila je da pozitivnu probu (fragment) treba dalje skraćivati, do najmanje moguće. Restriktione enzime ili kombinaciju enzima za skraćivanje proba smo birali empirijski.

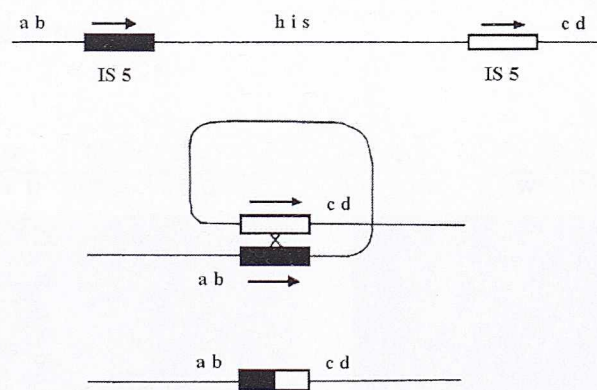


Slika 26. Šematski prikaz skraćivanja odgovarajućih DNK proba

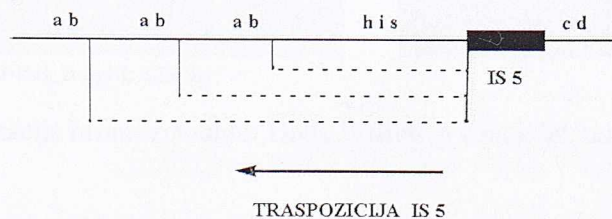
Dakle, klonirani *EcoRI/BglIII* fragment na M13mp18 veličine 0.9 kb je bio sekvenciran. Metodom klasičnog sekvenciranja prema Sanger-u, univerzalnim prajmerom smo sekvencirali 331 bp kloniranog fragmenta. Ova sekvenca je bila dovoljne dužine da se ubaci u NUCLEOTIDE SEQUENCE DATABASES i podvrgne kompjuterskoj analizi (Altschul et al., 1990). Ovaj program je optimiziran za traženje identičnih ili skoro identičnih sekvenci koje se nalaze u bazi podataka. Na naše iznenađenje, kompjuterska analiza nam je pokazala da je sekvenca od 331bp deo insercione sekvence IS5. Ovaj podatak je s jedne strane dao objašnjenje za veoma komplikovane slike restriktionih fragmenata u svim našim hibridizacijama, a s druge strane je opredelilo strategiju našeg daljeg rada.

4.4. ANALIZA LEVOG KRAJA DELECIIJE I DETEKCIJA IS5 SA OBE STRANE HIS OPERONA

Bilo je očigledno da IS5 učestvuje u promovisanju velikih delecija u *his* regionu. Kako? Moguća su bila dva modela, slika 27: (1) ako je *his* region omeđen sa dva IS5 elementa iste orijentacije oni mogu generisati delecije putem rekombinacije. U tom slučaju bi ukupan broj IS5 u soju sa delecijom u odnosu na parentalni soj trebalo da bude n-1, jer jedan ekvivalent IS5 biva eliminisan sa deletiranim fragmentom; (2) ako postoji IS5 samo s jedne strane *his* operona moguće je da mehanizam nastanka delecije prvo uključuje “intragenomski skok” IS5 preko *his* operona pri čemu bi se IS5 udvojila, a zatim bi došlo do rekombinacije kao u modelu (1). U tom slučaju ukupan broj kopija IS5 u divljem soju i deletantu bi bio isti. Merenje broja kopija IS5 ili testiranje postojanja još jedne IS5 s druge strane operona podržalo bi jednu od ove dve teorijske mogućnosti.



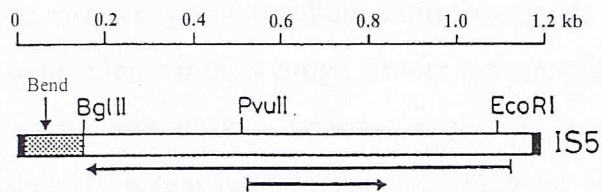
Model 1



Model 2

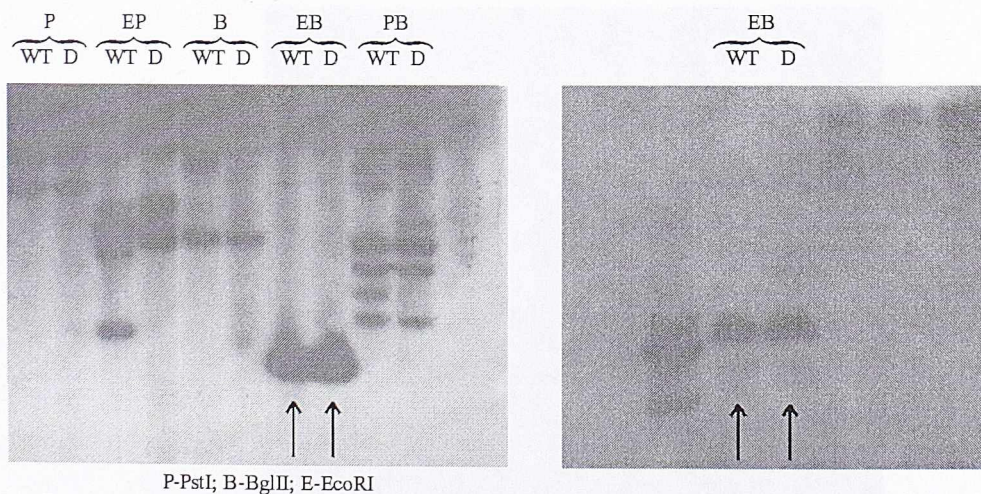
Slika 27. Modeli nastanka velikih delecija promovisanih IS5 elementima

Kako je već rečeno u uvodu ovog rada, IS5 je dugačka 1195 bp i fragment *EcoRI/BglII* koji smo mi klonirali predstavlja njen središnji deo i iznosi 940 bp, slika 28.



Slika 28. Uprošćena šema IS5 elementa (Muramatsu et al., 1988)

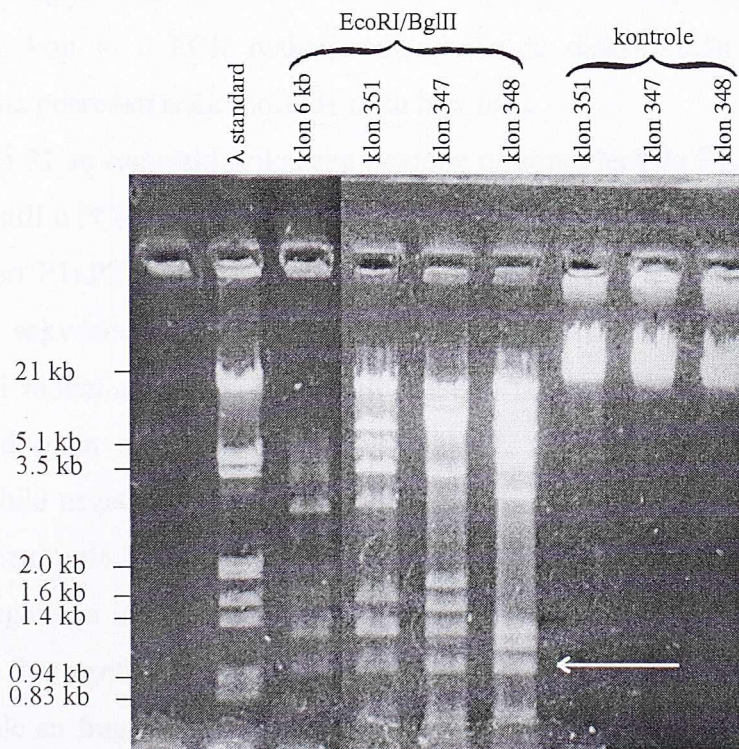
Na slici 29 su predstavljene dve dodatne autoradiografije gde je kao proba korišćena IS5 (fragment *EcoRI/BglII*), a hromozomalne DNK iz divljeg soja i deletanta su digerirane većim brojem različitih restrikcionih enzima. Među digestijama je i dvostruka digestija *EcoRI/BglII*, sa kojom pozitivan signal još jednom potvrđuje da je reč o IS5.



Slika 29. Hibridizacija hromozomalnih DNK iz divljeg soja i deletanta sa IS5 kao probom

Analizu levog kraja delecije otpočeli smo sa idejom da utvrdimo postojanje IS5 elementa i sa leve strane histidinskog operona. Na naš zahtev i interesovanje, od Kohare smo dobili detaljniju mapu segmenta hromozoma *E. coli*

i klonova sa kojima smo radili (347, 348 i 351), jer je od 1987. godine kada je Kohara prvi put objavio λ biblioteku, mapa bila korigovana i dopunjavana novim detaljima. Od njega smo dobili potvrdu da su IS5 elementi locirani na sva tri klona od interesa za nas – 347, 348 i 351. Ova informacija je podržala našu početnu hipotezu na osnovu prvih rezultata hibridizacije da se krajevi velike delecije nalaze na ovim klonovima. S druge strane, informacija o postojanju IS5 elemenata s obe strane histidinskog operona podržala je teorijski model o nastajanju velikih delecija putem homologe rekombinacije između repetitivnih sekvenci. Imajući klonirani i potvrđeni IS5 fragment od 940 bp i znajući njegovu poziciju na subklonu od 6 kb, digestijom klonova 347, 348 i 351 bilo je potvrđeno prisustvo identičnog fragmenta *EcoRI/BglIII* od 940bp u sva tri klona, slika 30. Strategija daljeg rada na detaljnoj analizi velikih delecija bila je kompletno zasnovana na PCR tehnologiji.



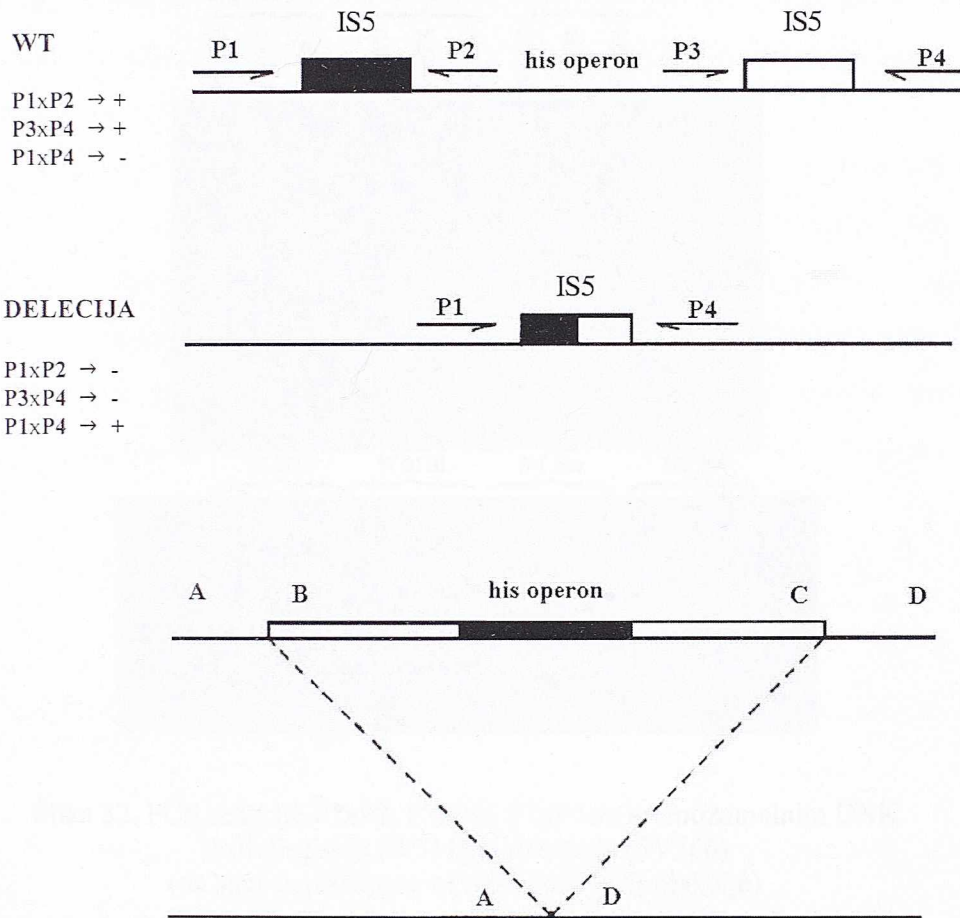
Slika 30. Prisustvo IS5 elementa (fragment *EcoRI/BglIII*) sa obe strane histidinskog operona

4.5. ANALIZA VELIKIH DELECIIJA PROMOVISANIH IS5 ELEMENTIMA PCR TEHNOLOGIJOM

Kompletna sekvenca hromozoma *E.coli* (Blattner et al., 1997) dala nam je mogućnost da primenom PCR tehnologije i sekvenciranja analiziramo proces rekombinacije koji dovodi do formiranja velikih delecija posredovanjem IS5 elemenata na nivou primarne strukture DNK. Dakle, imali smo tačnu lokaciju oba IS5 elementa u odnosu na histidinski operon i kompletno poznatu sekvencu celog regiona hromozoma koji smo analizirali. Pored ovoga, na osnovu naših rezultata hibridizacije i sekvenciranja, postavili smo hipotezu da velike delecije nastaju procesom rekombinacije između dva IS5 elementa iste orijentacije koji se nalaze sa obe strane histidinskog operona. Kako je napred već rečeno, model nastanka ovakvih delecija podrazumeva rekombinacioni događaj između homologih sekvenci koji rezultira u deleciji intermitentnog materijala i jednog ekvivalenta IS5. PCR strategiju smo zasnovali na toj činjenici i dizajnirali dva para oligonukleotida koji bi u PCR reakcijama trebalo da diskriminišu divlji soj i deletanta i da na posredan način potvrde našu hipotezu.

Na slici 31 su šematski prikazane pozicije oligonukleotida P1, P2, P3 i P4 koje smo koristili u PCR reakcijama.

Prajmeri P1xP2 amplifikuju "levu" IS5, dok prajmeri P3xP4 amplifikuju "desnu" IS5 sekvencu koje su prisutne u divljem soju. Ukoliko je naš pretpostavljeni model o nastajanju velikih delecija tačan, amplifikacije P1xP2 i P3xP4 bi u divljem soju dale pozitivan rezultat, dok bi kod deletanta obe amplifikacije bile negativne. Međutim, amplifikacija P1xP4 bi kod deletanta bila pozitivana i rezultirala bi u pojavi male trake, dok bi u divljem soju amplifikacija P1xP4 bila negativna iz razloga što Taq polimeraza nije u stanju da amplifikuje tako dugačke fragmente DNK (~35 kb). Sve tri amplifikacije – P1xP2, P3xP4, P1xP4 – davale su fragmente približno iste dužine (1414 bp, 1383 bp, 1403 bp). PCR reakcije su rađene paralelno na hromozomalnoj DNK iz divljeg soja i deletanta (94 °C, 1 min.; 60 °C, 30 s; 72 °C, 1 min.; 30 ciklusa).

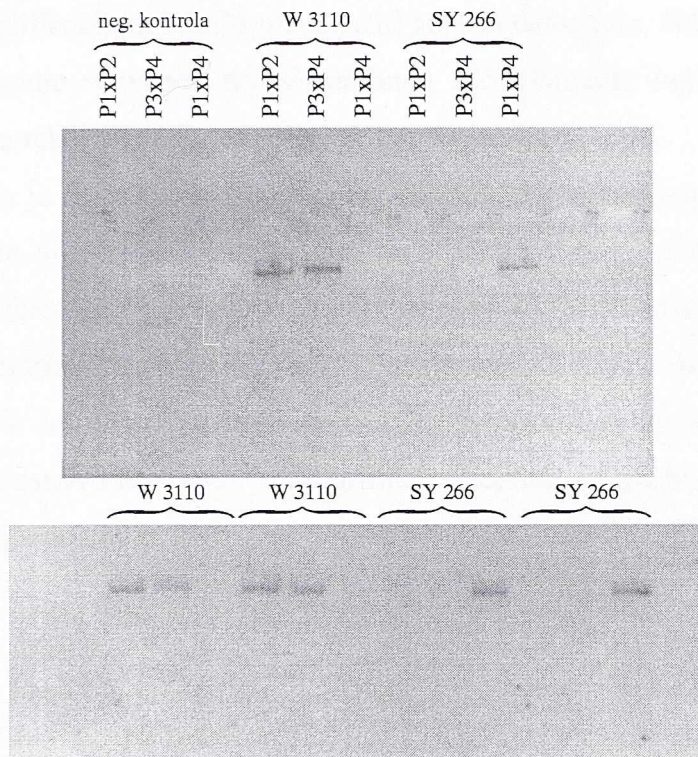


Slika 31. Strategija PCR tehnologije za diskriminaciju divljeg soja i deletanta

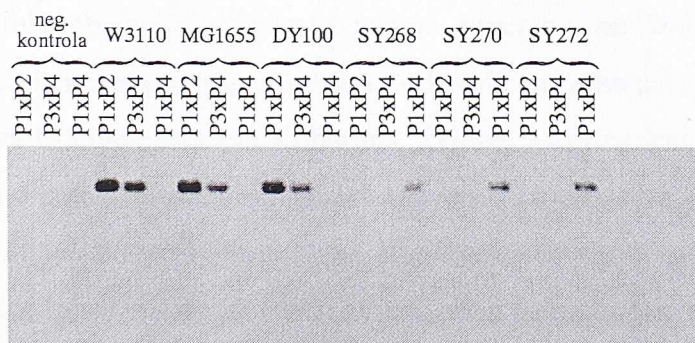
Na slici 32 su prikazane PCR reakcije koje veoma jasno diskriminiraju divlji soj i deleciju i na posredan način podržavaju pretpostavljeni model o nastanku velikih delecija rekombinacijom između dva IS5 elementa.

Na isti način, PCR reakcijama smo pokazali da su i ostala tri mutanta, SY268, SY270 i SY272, identični kao i SY266 koji je od početka bio korišćen kao model u analizi velikih delecija.

Na slici 33 su prikazane PCR reakcije (P1xP2, P3xP4, P1xP4) na divljim sojevima (MG1655, W3110 i DY100) i na preostala tri mutanta koji nose veliku deleciju.



Slika 32. PCR reakcije P1xP2, P3xP4 i P1xP4 sa hromozomnim DNK iz divljeg soja (W3110) i deletanta (SY266) (na slici su prikazane tri nezavisne PCR reakcije)



Slika 33. PCR reakcije P1xP2, P3xP4 i P1xP4 sa hromozomnim DNK iz divljih sojeva W3110, MG1655 i DY100 i deletanata SY268, SY270 i SY272

Dakle, PCR metodologija je pokazala da sve četiri velike delecije nastaju na isti način, odnosno da sve četiri sadrže po jedan “rekonstruisani” IS5 element koji je nastao u procesu rekombinacije između dva ekvivalenta IS5 koji omeđuju

histidinski operon. Rekombinovana IS5 sekvenca nalazi se na PCR fragmentima dobijenim amplifikacijom P1xP4 u sva četiri soja sa delecijom. Naš sledeći korak bio je određivanje sekvence novoformiranog IS5 elementa koji bi omogućio analizu procesa rekombinacije na nivou primarne strukture DNK.

Poznato je da je među insercionim sekvencama zastupljen polimorfizam, tj. da one nisu apsolutno identične. Na toj činjenici smo i zasnovali ideju o određivanju nukleotidne sekvence rekombinovanog IS5 elementa koji bi trebalo da sadrži polimorfne nukleotide iz obe IS5 sekvence iz kojih je nastao. Tek takva sekvenca bi bila definitivna potvrda da je došlo do rekombinacije između dva IS5 elementa, a na osnovu rasporeda polimorfnih nukleotida moglo bi se odrediti gde se rekombinacija dogodila.

4.6. ODREĐIVANJE PRIMARNE STRUKTURE REKOMBINOVANOG IS5 ELEMENTA

Nukleotidna sekvenca IS5 elementa bila je poznata od 1981. godine. Međutim, s obzirom na to da je kod IS elemenata zastupljen polimorfizam i da je naša analiza rekombinacije zahtevala veoma preciznu nukleotidnu sekvencu konkretnih IS5 elemenata čiju smo lokaciju odredili, informaciju o polimorfizmu između ova dva IS5 elementa (na Koharinoj fizičkoj mapi označenih kao IS5H i IS5I) dobili smo iz kompletne nukleotidne sekvence hromozoma *E. coli* (Blattner, 1997). Nukleotidna sekvenca hromozoma *E. coli* urađena je na divljem soju linije K-12, MG1655. Sojevi MG1655 i W3110 se danas uzimaju kao referentni divlji sojevi za *E. coli* K-12, mada soj W3110 sadrži jednu inverziju u delu hromozoma za ribozomalne gene. Koristeći podatke sa INTERNET-a i BLAST Search Program-a (Blast Entrez) (Altschul et al., 1997), dobili smo uporednu nukleotidnu sekvencu oba IS5 elementa u sojevima MG1655 i W3110. Komparativna analiza nukleotidne sekvence je pokazala identitet od 100% između ova dva soja u odnosu na IS5H i IS5I. Između IS5H i IS5I, odnosno “levog” i “desnog” IS5 elementa, otkrili smo 5 polimorfnih nukleotida koji su raspoređeni tako da po

jedan pada u oba terminusa IS5, a ostala tri padaju u središnji deo *EcoRI/BglIII* fragmenta. Na slici 34 su prikazane nukleotidne sekvence IS5H i IS5I sa označenim polimorfnim nukleotidima.

	1621	gaaatccagg	ctattgattc	aacgtcagcg	acagatctgc	gotgtaaag	aacttgtaa	
	1681	acaacgtaat	agaattatcc	ggaatggtgg	cgactatgca	ctagggaagg	tgcgataaag	IR
	1741	Tggggaaatt	cttctcggct	gactcagtc	tttcatttct	tcattgttga	gccgattttt	
	1801	tctcccgtaa	atgccttgaa	tcagcctatt	tagaccgttt	cttcgccatt	taaggcgta	
	1861	tcccagttt	ttagt gagat	ctctcccact	gacgtatcat	ttggtccgcc	cgaaacaggt	BglIII
	1921	tggccagcgt	gaataacatc	gccagttggt	talcgttttt	cagcaacccc	ttgtatctgg	
	1981	ctttcacgaa	gccgaactgt	cgcttgatga	tgcgaaatgg	gtgctccacc	Ttggcccggg	
	2041	tgcttgcttt	catgtattcg	atggtgatgg	ccgttttggt	cttgctggga	tgctgtttca	
	2101	aggtttctac	cttgccgggg	cgctcgggga	tcagccagtc	cacatccacc	tccggccagct	
	2161	cctcgcgctg	tggcgccct	tggtagccgg	catcggctga	gacaaattgc	tccttccat	
	2221	gcagcagatt	accagctga	ttgaggctcat	gctcgttggc	cgcggtggg	acTaggctgt	
A	2281	gggtcaggcc	Getcttggca	tcgacaccaa	tgtgggectt	catgccaaag	tgccactgat	
	2341	tgcctttctt	ggtctgatgc	atctccggat	cgcttctctg	ctctttgttc	ttggtcgagc	
	2401	tgggtgcctc	aatgatggtg	gcatcgacca	aggtgccttg	agtcacatg	acgcctgctt	
	2461	cgccagcca	gcgattgatg	gtcttgaaca	attggcgggc	cagttgatgc	tgctccagca	
	2521	ggtggcggaa	attcatgatg	gtggtgcggt	ccggcaaggc	gctatccagg	gataaccggg	
	2581	caaacagacg	catggaggcg	atctcgtaca	gagcatcttc	catcgcgcca	tcgctcaggt	
	2641	tgtaccaatg	ctgcatgcag	tgaatgcgta	gcatggtttc	cagcggataa	ggtcgcgggc	
	2701	cattaccagc	cttggggtaa	aacggctcga	tgacttccac	catgttttgc	catggcagaa	
	2761	tctgctccat	gcgggacaag	aaaatctctt	ttctggctctg	acggcgttta	ctgct gaatt	EcoRI
	2821	gactgtcggc	gaaggttaagt	tgatgactca	tgatgaacc	tgttcCattg	ctccagatga	IR
	2881	caaacatgat	ctcatatcag	ggact ttgttc	gcaccttccc	tagaacacca	caatttcgct	
	2941	ctctcggtaa	ggcactgtca	cagcattcaa	cagaatgtga	cttgccagat	ttattagcgc	
	3001	caccagatgt	ttaaccgggt	aaccacgacc	cagtcgggga	tatatccat	cttctcgtg	
	7981	tgatcctgcg	caccaatcaa	caaccgtatc	agaatagata	ctttctttag	gaatttttgt	
	8041	tttattaagg	aaggtgcgaa	taagCgggga	aattctcttc	ggctgactca	gtcatttcat	IR
	8101	ttcttcatgt	ttgagccgat	ttttctctcc	gtaaattgct	tgaatcagcc	tatttagacc	
	8161	gtttcttctc	catttaaggc	gttatcccca	gtttttagtg	agatctctcc	cactgaagta	BglIII
	8221	tcatttggtc	cgcccgaaac	aggttggcca	gctgaataa	catcgcagc	tggttatcgt	
	8281	tttccagcaa	ccccttgat	ctggctttoa	cgaagccgaa	ctgtcgcctg	atgatcggaa	
	8341	atgggtgctc	caccCtggcc	cggatgctgg	ctttcatgta	ttcgatggtg	atggccggtt	
	8401	tgttcttgcg	tggatgctgt	ttcaagggtc	ttacctgccc	ggggcgcctc	gcgatcagcc	
	8461	agtcacatc	cacctcggcc	agctcctcgc	gctgtggcgc	cccttggtag	ccggcatcgg	
	8521	ctgagacaaa	ttgctcctct	ccatgcagca	gattaccacg	ctgattgagg	tcattgctct	
B	8581	tggccgcggt	ggtgacCagg	ctgtgggtca	ggccActctt	ggcatcgaca	ccaatgtggg	
	8641	ccttcatgcc	aaagtgccac	tgattgcctt	tcttggctcg	atgcatctcc	ggatcgcgtt	
	8701	gctgctcttt	gttcttggtc	gagctgggtg	cctcaatgat	gggtggcctc	accaaggtgc	
	8761	cttgagctcat	catgacgcct	gcttcggcca	gccagcgatt	gatggtcttg	aacaattggc	
	8821	gggccagttg	atgctgctcc	agcagggtgg	ggaaattcat	gatggtgggt	cggtccggca	
	8881	aggcgcctatc	cagggataac	cgggcaaaaca	gacgcattgga	ggcgatttcc	tacagagcat	
	8941	cttccatcgc	gccatcgcct	aggttgtacc	aatgctgcat	gcagtgaatg	cgtagcatgg	
	9001	tttccagcgg	ataaggctcg	cggccattac	cagccttggg	gtaaaacggc	tcgatgactt	
	9061	ccaccatggt	ttgccatggc	agaatctgct	ccatgcggga	caagaaaatc	tctttctctg	
	9121	tctgacggcg	cttactgctg	aattcactgt	cggcgaaggt	aagttgatga	ctcatgatga	EcoRI
	9181	accctgttct	atggctccag	atgacaaaca	tgatctcata	tcaggga ctt	gttccgacct	IR
	9241	tcct taatcc	ctaacataaa	tgacacaata	aaatcagaaa	gcacaggaaa	ttttcttacg	

Slika 34. Nukleotidne sekvence IS5H (A) i IS5I (B) elemenata sa označenim polimorfnim nukleotidima

Naša prvobitna strategija za sekvenciranje je bila da četiri PCR fragmenta (1403 bp) dobijena amplifikacijama P1xP4 kloniramo tako što ćemo ih amplifikovati oligonukleotidima P1 i P4 kojima smo na krajevima dodali restrikciona mesta *HindIII* i *PstI* (P1H i P4P). Međutim, susreli smo se sa problemom da su svi klonovi koji su nosili fragment sa celom IS5 sekvencom pokazivali izuzetno veliku nestabilnost, dok su klonovi sa fragmentom *EcoRI/BglIII* kojima su nedostajali terminusi bili potpuno stabilni. O nestabilnosti klonova i o problemu kloniranja PCR fragmenta koji nosi celu IS5 biće reči u diskusiji ovog rada, jer je, kako smo kasnije ustanovili, ovaj problem bio vezan za strukturu same sekvence IS5 elementa, odnosno njenog levog terminusa.

Pošto nismo uspevali da dobijemo klon sa celom IS5 odlučili smo da tehnologijom automatskog sekvenciranja direktno sekvenciramo PCR fragmente. Sledeći protokol za automatsko sekvenciranje PCR fragmenata načinjen za aparat tipa 373A koji smo koristili, sekvencirali smo oba lanca pri čemu smo za svaki lanac DNK koristili po četiri prajmera: jedan eksterni (spoljašnji) i tri interna (unutrašnja). Kao spoljašnje prajmere smo koristili P1 i P4, dok smo unutrašnje prajmere (P5-P10) dizajnirali tako da polimorfni nukleotidi ne budu uključeni u njih. Na slici 35 (A i B) su prikazane pozicije prajmera za sekvenciranje.

Međutim, iako smo imali nukleotodne sekvence IS5 elemenata iz divljih sojeva objavljenih u literaturi, morali smo da sekvenciramo i IS5 elemente iz parentalnog soja koji nosi *polA1* mutaciju, DY100, iz koga smo izolovali mutante kako bismo sa njima uporedili rekombinovanu IS5. Naravno, ovo je podrazumevalo sekvenciranje oba IS5 elementa, a to znači PCR fragmente P1xP2 i P3xP4, pri čemu smo menjali spoljašnje prajmere, dok su unutrašnji prajmeri bili isti (P5-P10). Pošto soj DY100 vodi poreklo od W3110, ovaj soj smo takođe uvrstili u sekvenciranje, a pored njega i MG1655 kao još jedan referentni soj za proveru zvanične sekvence iz literature sa našom sekvencom. Dakle, naš materijal za sekvenciranje je bio prilično obiman jer smo pored rekombinovanih IS5 elemenata sekvencirali i native IS5 elemente iz tri soja.

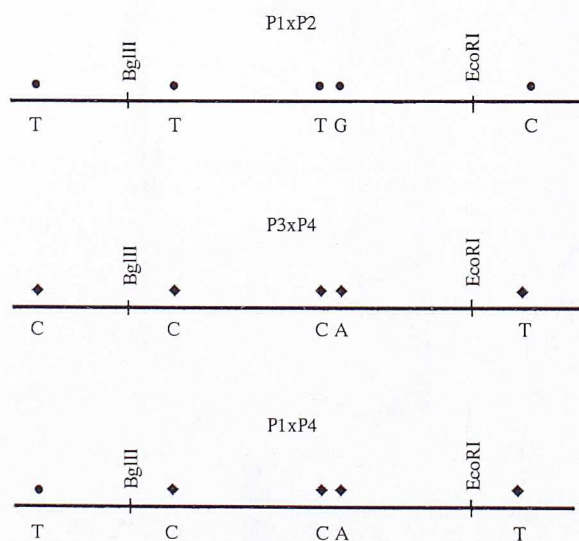
1381 atccccacc gttgctgacc gcaaaacatt tacgcgatta atactgcecg taataaatt
1441 aaaaatccag cattctcaat ccattaecgaa ataagatggc attacggaat agccagactt
1501 tctcgtgta acgtccgaca aaatgcegtca ttgacagcgg tttctgtgga ttgacacatt
1561 tcattccagat aatgaattaa tgctactgcc ggaacaacca gcaaacggcg attgtgttct
P1 1621 gaaatccagg ctattgatcc aacgtccagg acagatctgc gctgtaaaag aacttgtaaa
1681 acaacgtaat agaattatcc ggaatgggtg cgactatgca ctagg~~gaaagg~~ tccgaataag IR
1741 Tggggaaatt cttctcggct gactcagtea tttcatttct tcatggttga gccgattttt
1801 tctcccgtaa atgocctgaa tcagocctatt tagaccgttt cttegccatt taaggcgta
1861 tccccagttt ttagtgagat ctctccact gacgtatcat ttggtccgcc cgaaacaggt
1921 tggccagcgt gaataacatc gccagttggt tctcgttttt cagcaacccc ttgtatctgg
P5 1981 ctttcacgaa gccgaactgt cgcttgatga tgcgaaatgg gtgctccacc Tgggcccga
2041 tgctgggttt catgtattcg atgttgatgg ccgttttggt cttgocgga ttgcttttca
2101 aggttcttac cttgcccggg cgctcggcga tccgcccagtc cacatccacc tccgcccagct P10
A 2161 cctcgcgctg tggcgccctt tggtagccgg catcggctga gacaaatgc tctctccat
2221 gacgagatt acccagctga ttgaggtcat gctcgttggc cgcggtggg acTaggctgt
P7 2281 gggtcaggcc Gctcttgga tcgacacca tgtgggectt catgccaaag tcccactgat
2341 tcgctttctt ggtctgatgc atctccggat ccgcttgcgt ctctttgttc ttggtccagg
2401 tcgcttcttc aatgatgggt gcatcgacca aggtgccttg agtcatcatg acgctgctt P8
2461 cggccagcca gogattgatg gtcttgaaca attggcgggc cagttgatgc tgctccagca
2521 ggtggcggaa attcatgatg gtggtgcggt ccggcaaggc gctatccagg gataaccggg
P9 2581 caaacagacg catggaggcg atttcgtaca gagcatcttc catcgcgcca tcgctcagg
2641 tgtaccaatg ctgcatgcag tgaatgcgta gcatggtttc cagcggataa ggtcgcggc
2701 cattaccagc cttggggtaa aacggctcga tgacttccac catgttttgc catggcagaa P6
2761 tctgctccat ggggacaag aaaaatctct tctgggtctg acggcgctta ctgctgaatt
2821 cactgtcggc gaaggttaagt tgatgactca tgatgaacce tgttcCatgg ctccagatga
2881 caaacatgat ctcatatcag gga~~ctt~~gttc gcacctccc tagaacoca caatttcgct IR
2941 ctctcgttaa ggcactgca cagcattcca cagaatgtga cttgocagat taatttagcc
3001 caccagatgt ttaaccgggt aaccacgacc cagtcgggga tatattccat cttctcgtg P2
3061 acatcatcaa gaataaaaag gtttatcaca ctcagagcaa cgtttctcag caggccggat
3121 aattcttcaa catttagaag atgtgttatt aaaggcatac aaactggacg tattgtatt
3181 tcttttggtg gttgaoccaa ggtagcagt tatcctgatg cgtgagatt tctgtaatat
3241 ctacgtcaac attctcctg aatagaaaat gcagccccg caagtgatcc acatttttta

7741 taaaatacgt tttctggcta aatatctaaa agtacttttt aagtgccato tgaaggcttt
7801 tgaaaaaaaa cttcgattgt catgatgagc ataatgtatc gcatgaaaag cgggaacata
7861 atgaagtctg acaccagcca ggctaaagcct caagcacagg tcaatatctt cacagtcact
7921 aaagtaacct tgatcgaagc catttacacg cacaaaatct gaaaaacgta ccagcataaa
P3 7981 tgatcctcgc caccaatcaa caaccgtatc agaatagata ctttctttag gaatttttgt IR
8041 tttattaagc aaaggtgcgaa taagCgggga aattcttctc ggctgactca gtcatttcat
8101 tttctcatgt ttgagccgat ttttctccc gtaaatgctt tgaatcagcc tatttagacc
8161 gtttcttgc catttaaggc gttatcccca gtttttagtg agatctctcc cactgacgta
8221 tcaatttggc cgcccgaac aggttggcca gcgtgaataa catgccagtg ttggttatcgt
8281 ttttcagcaa cccctgtat ctggcttcca cgaagccgaa ctgtcgcctg atgattccgaa
P5 8341 atgggtgctc caccCtggcc cggatgctgg ctttcatgta ttcagatgtg atggccgctt
8401 tgttcttgcg tggatgctgt ttcaagggtc ttacctgccc gggcgctcgc gcgatcagcc P10
8461 agtccacatc cacctcggcc agctcctcgc gctgtggcgc cccttggtag ccggcatcgg
8521 ctgagacaaa ttgctcctct ccatgcagca gattaccagc ctgattgag tcatgctcgt
8581 tggcgcgggt ggtgacCagg ctgtgggtca ggcActctt ggcacgaca ccaatgtggg
P7 8641 ccttcatgcc aaagtccac tgattgctt tcttggctg atgcatctcc ggatcgcgtt
8701 gctgctcttt gttcttggct gagctgggtg cctcaatgat ggtggcatcg accaagggtc P8
8761 cttgagtcac catgaocctt gcttcggcca gccagcgatt gatggtcttg aacaattggc
8821 gggccagttg atgctgctcc agcaggtggc ggaattcat gatggtggg ccgctccgca
8881 aggcgctatc cagggataac cgggcaaaaca gacgcagga ggcgatttgc tacagagcat
P9 8941 cttccatcgc qccatcgcgc aggttgtacc aatgctgcat gcagtgatg cgtagcatgg
9001 tttccagcgg ataaggctgc cggccattac cagccttggg gtaaaacggc tcgatgactt P6
9061 ccaccatgtt ttgcccagc agaattctgt ccatgcccga caagaaaatc tcttttctgg
9121 tctgacggcg cttactgctg aatlcaactg cggcgaagg aagttgatga ctoatgatga
9181 accctgltcT atggctccag atgacaaaaca tgatctcata tcagggactt gttcgcacct IR
9241 tccttaatcc ctaacataaa tgacacaata aaatcagaaa gcacaggaaa ttttcttacg
9301 gaataatcat gtaaagattt cgcttcatct cggaacaggc ataatgtact aaaagcataa P4
9361 cgcttacttt cgacatattt aatatatgto agcaaatcat catgcttcat gatgatcgc
9421 ggattcaaaa acaaaatgta atcatcatct cggggtctat attttctct tacatacgc
9481 accgcaatat tattattatg accaaagccg tatacacctc cactaatata gtccaggcct
9541 gcataatgct ggcataattg tttcaataat agagagctct tgttgcgcg tacgataatc
9601 ttgtagtgtc catcgtcagc attaagattt tcagtaatt ttttgatgta gcttctatgt

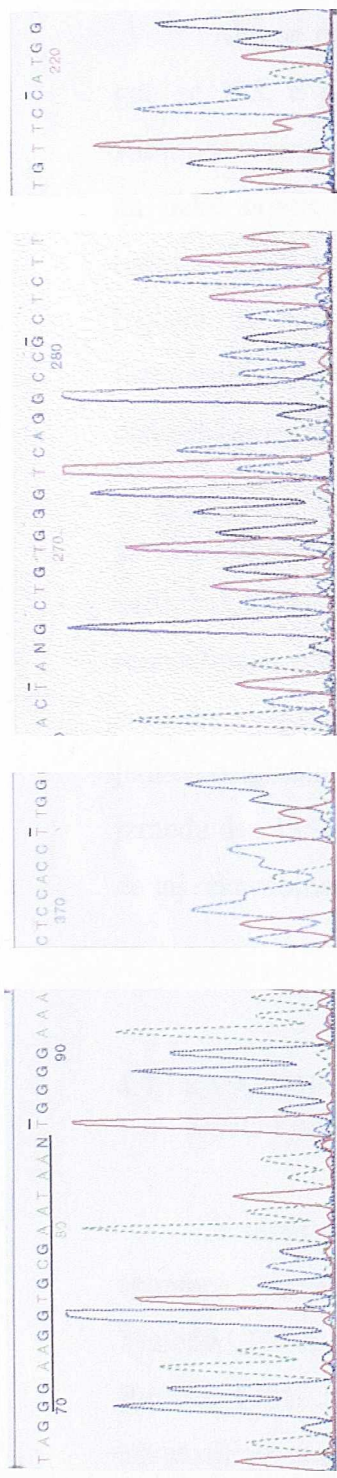
Slika 35. Pozicije prajmera za sekvenciranje IS5H (A) i IS5I (B)

Sekvence IS5 elemenata koje smo dobili automatskim sekvenciranjem PCR fragmenata P1xP2 i P3xP4 su pokazale apsolutnu identičnost sa sekvencom objavljenom u literaturi (MG1655, W3110). Sekvenca IS5 elemenata u *polA1* soju DY100 takođe je bila potpuno identična sa ovim sekvencama iz divljih sojeva. Dakle, prisustvo pet polimorfni nukleotida u 1195 bp dugačkim sekvencama dva IS5 elementa bilo je evidentno u sva tri soja, što se na našim sekvencama veoma lepo može videti, prilog 7.

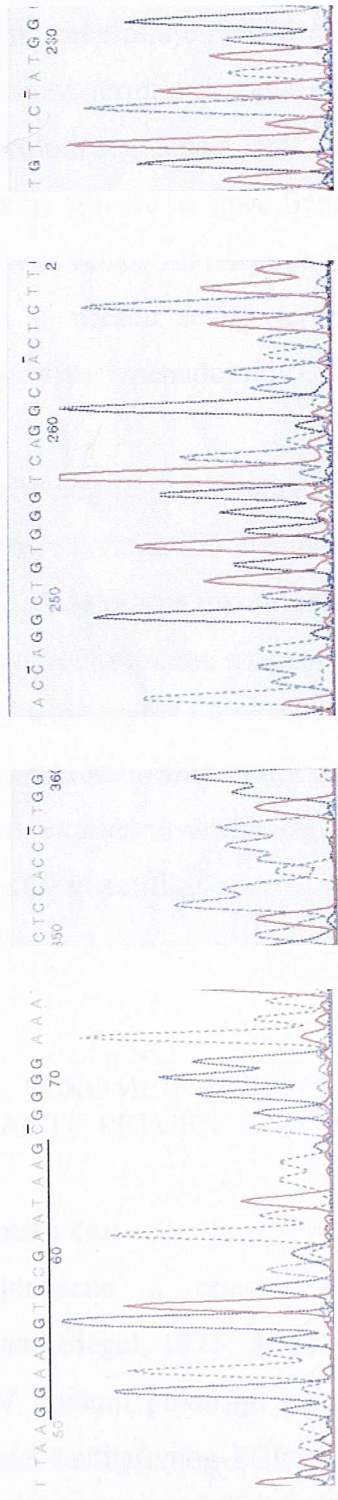
U sve četiri “rekombinovane” IS5 sekvence dobijene u amplifikacijama P1xP4, kako smo i očekivali, bili su prisutni polimorfni nukleotidi iz oba IS5 elementa, što potvrđuje da su one nastale rekombinacijom iz nativnih IS5. Raspored polimorfni nukleotida – po jedan nukleotid iz levog terminusa “levog” IS5 elementa (IS5H) i četiri nukleotida iz “desnog” IS5 (IS5I) – bio je identičan kod sva četiri deletanta, što je nedvosmisleno ukazivalo da se proces rekombinacije odvija na isti način i da rekombinacija uvek “prolazi” kroz levi terminus IS5 elementa. Na slici 36 je data jedna uprošćena šema rasporeda polimorfni nukleotida u nativnim i rekombinovanim IS5, a na slici 37 su prikazane i automatske sekvence, odnosno fragmenti iz automatskih sekvenci na kojima su označeni polimorfni nukleotidi u nativnim i rekombinovanim IS5.



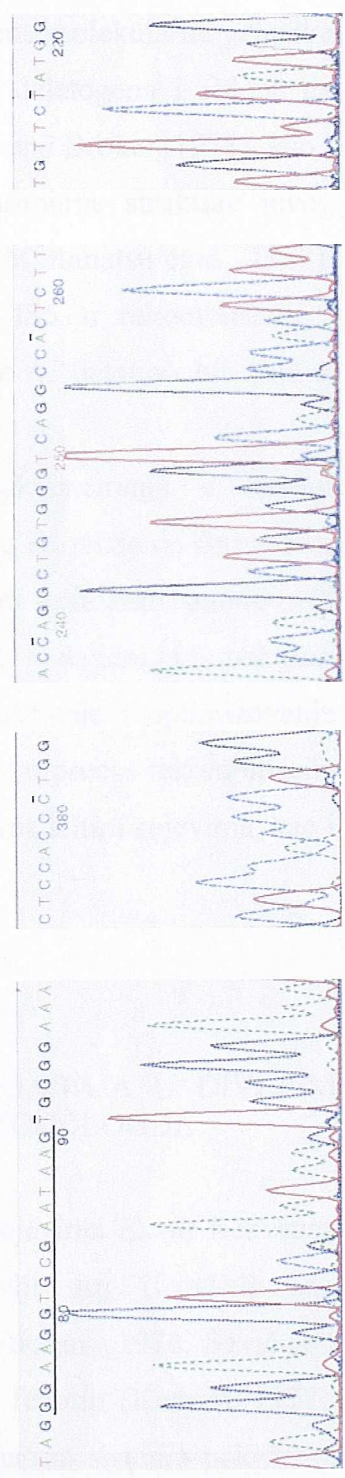
Slika 36. Šematski prikaz rasporeda polimorfni nukleotida u nativnim i rekombinovanim IS5 elementima



P1xP2



P3xP4



P1xP4

Slika 37. Automatske sekvence nativnih (P1xP2, P3xP4) i rekombinovanih (P1xP4) IS5

Ako se pozovemo na neke ranije radove iz klasične molekularne genetike gde se IS5, a pogotovu njeni terminusi, pominje kao deletogena i sklona da stimuliše rekombinaciju okolnih segmenata DNK (Chow and Broker, 1978), kao i na neke novije radove koji govore o specifičnosti primarne strukture levog terminusa IS5 koja uslovljava veliko zakrivljenje DNK (Muramatsu et al., 1988), izgleda da naši rezultati o učešću levog terminusa IS5 u rekombinaciji i formiranju velikih delecija nisu iznenađujući. O ovome će detaljno biti reči u diskusiji ovog rada.

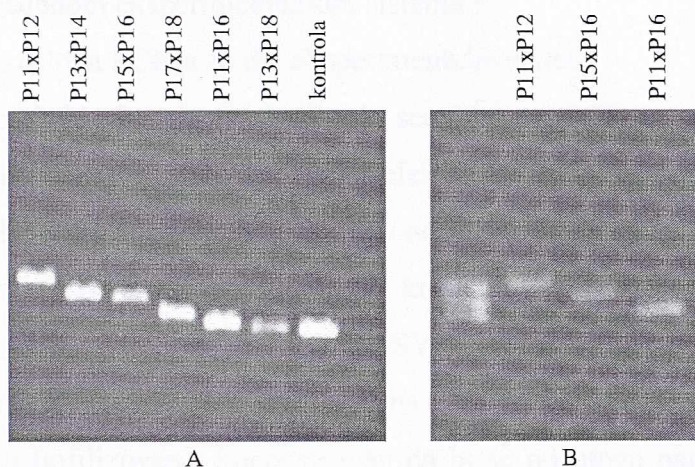
Primena PCR tehnologije i automatskog sekvenciranja u analizi genomskih rearanžmana posredovanih IS5 elementima koji dovode do formiranja velikih delecija, omogućile su da proces rekombinacije i molekularnu osnovu ovih rearanžmana studiramo na nivou primarne strukture DNK. U daljem radu pokušali smo da mogućnosti PCR tehnologije iskoristimo za kreiranje i optimizovanje jednog originalnog sistema u kome bismo mogli da pratimo proces rekombinacije između dve IS5 detekcijom rekombinovanih molekula u različitim sojevima, kao i da taj rekombinacioni događaj kvantifikujemo.

4.7. KVANTIFIKACIJA REKOMBINACIONOG DOGAĐAJA U DIVLJEM SOJU I *polA1* MUTANTU PRIMENOM PCR METODOLOGIJE

S obzirom na poznatu činjenicu da je u *polA1* sojevima *E.coli* frekvencija spontane mutageneze povišena u odnosu na divlji soj (Coukell and Yanofski, 1970; Vaccaro and Siegel, 1975; Siegel and Vaccaro, 1978; Savić and Romac, 1982) i da *polA1* mutanti pokazuju hiper-Rec fenotip (Konrad, 1977), iskoristili smo tehnologiju kvantitativnog PCR-a da u našem sistemu pokažemo eventualnu razliku u frekvenci rekombinacije između divljeg soja i *polA1*. Kvantifikacija mutacionog događaja podrazumevala je komparativnu analizu između divljeg soja i *polA1*.

Za ovu vrstu analize dizajnirali smo nove oligonukleotide za PCR (P11-P18) koji amplifikuju "levu" i "desnu" IS5 sekvencu pri čemu se amplifikovani

DNK fragmenti razlikuju po dužini, slika 38. Za svaku IS5 smo kreirali po dva para prajmera (spoljašnji i unutrašnji par) kako bismo mogli da primenjujemo tehniku sekundarnog PCR-a.



Slika 38. (A) PCR fragmenti različitih dužina.
(B) PCR fragmenti različitih dužina zajedno i odvojeno.

P11xP12 = 1658 bp	-----	leva IS5
P13xP14 = 1562 bp	-----	leva IS5
P15xP16 = 1540 bp	-----	desna IS5
P17xP18 = 1462 bp	-----	desna IS5
P11xP16 = 1408 bp	-----	rekombinovana IS5
P13xP18 = 1377 bp	-----	rekombinovana IS5

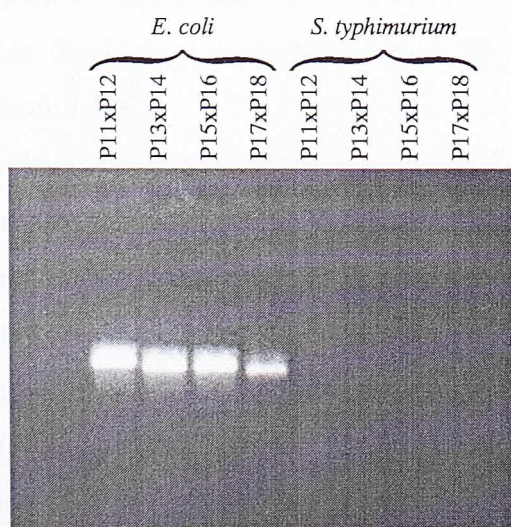
Da bismo pratili efekat *polA1* alela, za komparativnu analizu smo odabrali izogene sojeve: W3110 kao divlji soj i P3478 kao soj sa *polA1* mutacijom. U PCR reakcijama je korišćena hromozomalna DNK izolovana iz deset nezavisnih kultura. DNK iz mutantnog soja SY266 koji nosi veliku deleciju koristili smo kao kontrolu u eksperimentima kvantitativnog PCR-a.

4.7.1. Određivanje senzitivnosti PCR metode

Dva osnovna zahteva za primenu tehnologije kvantitativnog PCR-a su:

- 1) određivanje senzitivnosti PCR metode za amplifikaciju određenog PCR produkta u određenom eksperimentalnom sistemu i
- 2) optimizacija uslova PCR-a za dat eksperimentalni sistem.

Prvi korak bio je odrediti kolika je senzitivnost PCR metode da u smeši normalnih i mutiranih (rekombinovanih) molekula amplifikuje mutirane molekule koji su zastupljeni u veoma malom broju u odnosu na native. Zato smo uradili rekonstrukcioni eksperiment u kome smo koristili tri para prajmera (P11xP4, P1xP16, P13xP18). Iz mutantnog soja SY266 smo amplifikovali mutirani (rekombinovani) molekul IS5 čija je dužina iznosila 1408 bp (P11xP4). Ovaj fragment je bio liofilizovan i koncentrovan da bi se od njega napravile različite dilucije. Izračunali smo molekulsku težinu ovog fragmenta (Sambrook et al., 1989) pa smo na osnovu koncentracije DNK određene na spektrofotometru mogli da izračunamo broj molekula. Tako smo napravili seriju dilucija od 10^{10} - 10^1 molekula. Kao “prateću” (inertnu) DNK koristili smo hromozomalnu DNK iz *Salmonella typhimurium* pošto smo testiranjem naših oligonukleotida u PCR reakcijama sa ovom DNK dobili negativnu reakciju, slika 39.



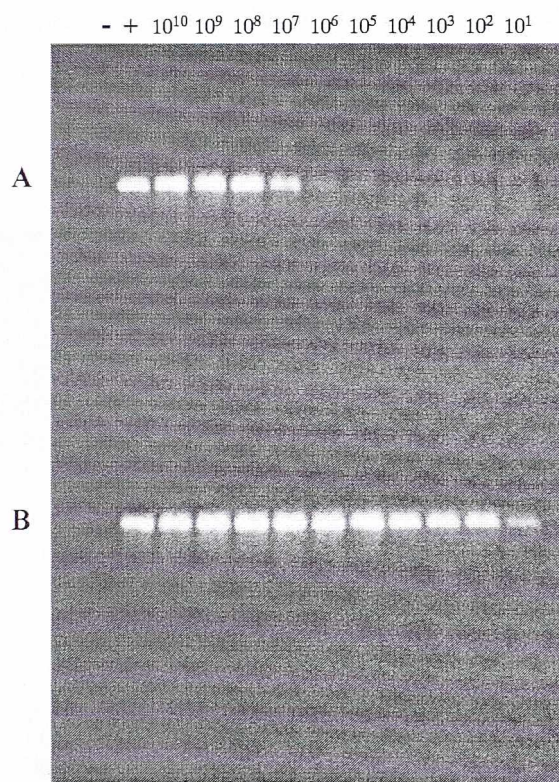
Slika 39. PCR amplifikacije (P11xP12, P13xP14, P15xP16, P17xP18) sa hromozomalnim DNK iz *E.coli* i *S.typhimurium*

To znači da će u smeši hromozomalne DNK iz *S.typhimurium* i mutiranih molekula amplifikovanih iz *E.coli*, sve PCR amplifikacije poticati od mutiranih molekula čiji je broj bio poznat.

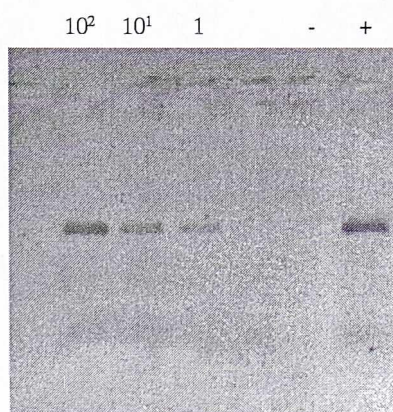
U rekonstrukcionom eksperimentu smo pravili smeše u kojima smo u 1 μ g hromozomalne DNK iz *S.typhimurium* dodavali određen broj mutiranih molekula u seriji od 10^{10} – 10^1 . Kada su ovakve smeše bile podvrgnute PCR reakcijama uz korišćenje internih prajmera P1xP16, dobili smo amplifikaciju mutiranih molekula pri čemu je poslednja vidljiva traka bila na diluciji koja odgovara broju molekula od 10^5 , slika 40(A). S obzirom na to da agarozni gel i etidijum-bromid imaju svoja ograničenja u detekciji, sve PCR reakcije smo podvrgli sekundarnom PCR-u, slika 40(B). U svaku reakciju smo dodavali po 1 μ l iz prvog PCR-a (1/50 volumena) i interne prajmere P13 x P18, a zatim smo ponovili isti PCR protokol. Sekundarni PCR inače povećava specifičnost amplifikacije (senzitivnost je ista ili čak veća od Southern blotting-a) i omogućava nam da detektujemo da li su u smeši prisutni mutirani molekuli. Na slici 40 su prikazana paralelno oba PCR-a (A i B) gde se jasno vidi da amplifikacija u sekundarnom PCR-u postoji do poslednje dilucije gde broj molekula iznosi 10. U dodatnom eksperimentu smo pokazali da se slaba traka uočava i u diluciji manjoj za jedan red veličine od poslednje na slici 40(B), što bi prema našoj kalkulaciji bio jedan molekul, slika 41. Ovom rekonstrukcionim eksperimentom pokazali smo da se ovako dizajniranim PCR-om u našem sistemu može detektovati prisustvo i ispod 10 mutiranih molekula u smeši sa hromozomalnom DNK.

Osim rekonstrukcionog eksperimenta uradili smo i kontrolni eksperiment kvantifikacije sa hromozomalnom DNK iz mutantnog soja SY266. Na osnovu poznate veličine hromozoma mogli smo da izračunamo njegovu molekulsku težinu (Sembrook et al., 1989) i da na osnovu koncentracije DNK odredimo broj kopija hromozoma (genoma). U odnosu na prethodni eksperiment ovo je bila proba da *in situ* na hromozomu PCR-om amplifikujemo mutirane molekule znajući da svaka kopija hromozoma nosi po jedan. Napravili smo seriju dilucija hromozomalne DNK polazeći od 10^7 do jedne kopije genoma i sve podvrgli

PCR-u koristeći prajmere P11xP16. Eksperiment je urađen isto kao i prethodni, dakle, sa sekundarnim PCR-om.

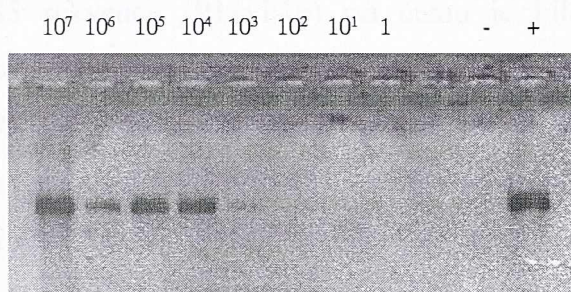


Slika 40. Rekonstrukcioni eksperiment PCR' (A) i PCR'' (B) sa opadajućim dilucijama DNK (od 10^{10} do 10^1 molekula)

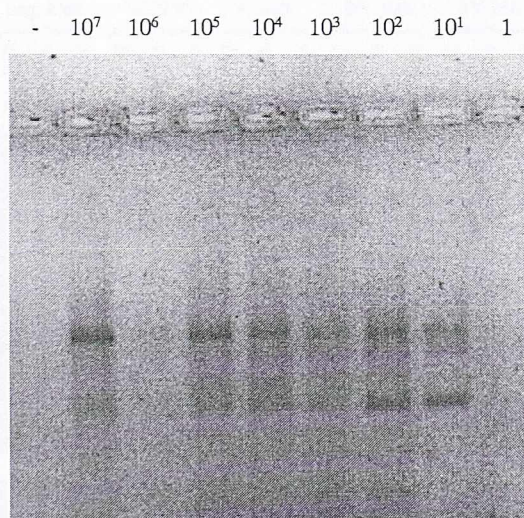


Slika 41. PCR'' sa brojem molekula 10^2 , 10^1 i 1

Na slici 42 se može videti da se u reakciji prvog PCR-a poslednja traka vidi na razblaženju od 10^{-5} što odgovara broju kopija hromozoma od 10^3 . U sekundarnom PCR-u sa internim prajmerima P13xP18 specifičnost amplifikacije je povećana tako da se poslednja traka vidi na razblaženju od 10^{-7} što odgovara broju kopija hromozoma od 10, slika 43.



Slika 42. PCR' amplifikacija P11xP16 sa opadajućim dilucijama hromozomalne DNK iz deletanta SY266

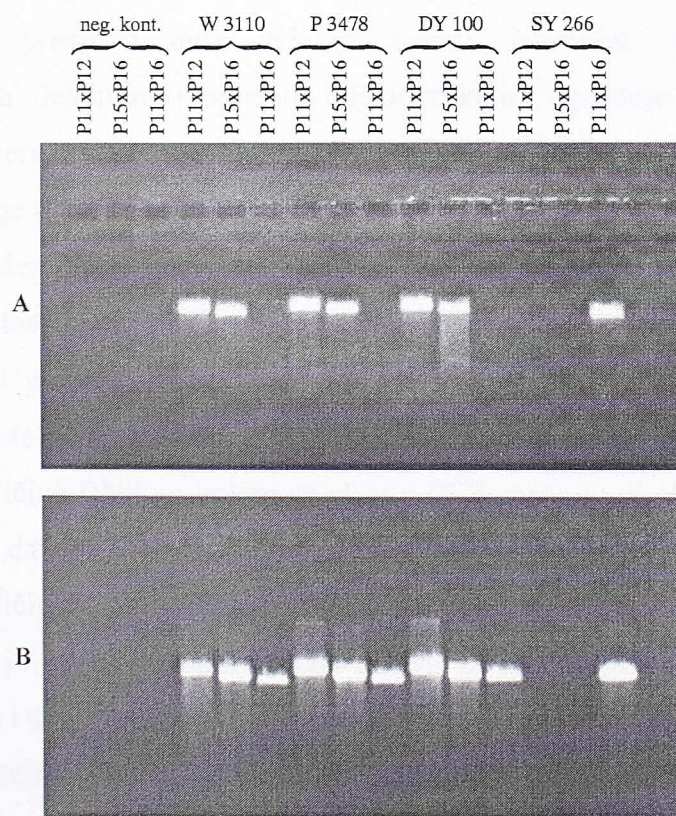


Slika 43. PCR'' amplifikacija P13xP18

Oba eksperimenta su poslužila kao reference za određivanje senzitivnosti i moći PCR-a da detektuje mutante. U svim pomenutim PCR reakcijama koristili smo običnu AmpliTaq polimerazu koja je za ovu vrstu eksperimenata bila sasvim zadovoljavajuća. Kao dodatni faktor koji povećava specifičnost reakcije koristili smo 5% DMSO. Pored velike mogućnosti kontaminacije i nerepetitivnosti,

nedostatak sekundarnog PCR-a je i pojava raznih sekundarnih produkata. Ipak, njegovu prednost da amplifikuje molekule koji su zastupljeni u veoma malom broju kopija, iskoristili smo da detektujemo prisustvo mutiranih molekula u divljem soju W3110 i sojevima koji nose *polA1* mutaciju, P3478 i DY100.

U prvom PCR-u, hromozomalne DNK iz sva tri soja su bile podvrgnute amplifikaciji eksternim prajmerima za "levu" (P11xP12), "desnu" (P15xP16) i rekombinovanu IS5 sekvencu (P11xP16) pri čemu je bilo evidentno da su amplifikacije P11xP16 negativne u sva tri soja, slika 44(A). Međutim, u sekundarnom PCR-u sa internim prajmerima za "levu" (P13xP14), "desnu" (P17xP18) i rekombinovanu IS5 (P13xP18), dobili smo amplifikaciju i mutiranih molekula u sva tri testirana soja, slika 44(B). Ovo znači da su rekombinovani molekuli prisutni u veoma malom broju u bakterijskoj kulturi i divljeg soja i *polA1* mutanata.



Slika 44. PCR reakcije hromozomalnih DNK iz sojeva W3110, P4378, DY100 i SY266.

(A) PCR': amplifikacije P11xP12, P15xP16 i P11xP16

(B) PCR'': amplifikacije P13xP14, P17xP18 i P13xP18

Produkte amplifikacije sekundarnog PCR-a mutiranih sekvenci (P13xP18) iz sva tri soja smo purifikovali i sekvencirali na isti način kao i sve prethodno opisane PCR fragmente. Analizom sekvence rekombinovanih IS5 uočen je identičan raspored polimorfničkih nikleotida kao u sva četiri prethodno analizirana deletanta, što govori da se rekombinacija uvek dešava na istom mestu i da *polAI* ne pokazuje nikakvu specifičnost u tom smislu u odnosu na WT.

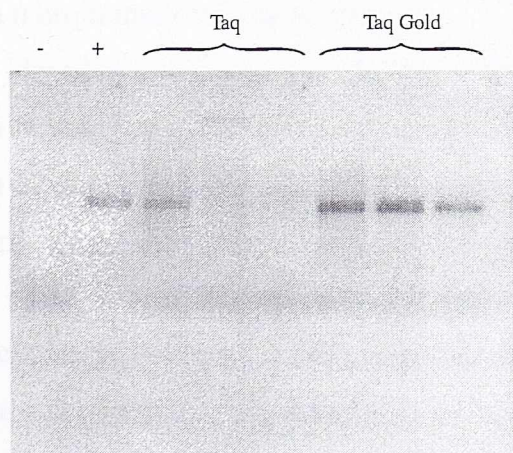
4.7.2. Optimizacija uslova za kvantifikaciju rekombinacije između dve IS5 primenom PCR-a

U optimizaciji uslova PCR reakcije za kvantifikovanje delecija imali smo dva pravca. Jedan pravac je bio amplifikacija samo mutiranih molekula u sojevima W3110 i P3478 uz korišćenje jednog seta prajmera za to, P11xP16. Drugi pravac je bio simultana amplifikacija sa dva seta prajmera koji amplifikuju oba IS5 elementa (P11xP12 i P15xP16), što odražava normalnu konstelaciju hromozoma i prisustvo ovih IS5 na njemu. Međutim, usled prisustva rekombinovanih (deletiranih) molekula u PCR reakciji, "spontano" će se formirati i treći set prajmera, P11xP16, koji će amplifikovati mutirane molekule. Ovaj drugi pravac simultane amplifikacije normalnih i mutiranih molekula je jedna varijanta metode "multiplex" PCR-a. Ovakav PCR sistem je mnogo relevantniji u praćenju mutiranih molekula, ali je u isto vreme i mnogo kompleksniji za rad.

Osnovni problem sa kojim se istraživači suočavaju u radu sa PCR-om kada žele da detektuju prisustvo malog broja nekih target sekvenci u populaciji, jeste velika količina DNK sa kojom se ulazi u PCR reakciju. S obzirom na to da smo mi želeli da detektujemo retke mutante, morali smo da krenemo u PCR reakciju sa količinom DNK koja je iznosila između 10^9 i 10^8 genoma (10^8 je 500 ng DNK), što je zahtevalo optimizaciju uslova za PCR ("performance of PCR amplification") i definisanje svih komponenti i faktora koji učestvuju u reakciji.

Najznačajniji faktor kojim smo postigli željene uslove PCR-a je korišćenje novog enzima, AmpliTaqGold polimeraze, koja je specijalno napravljena za multiplex PCR i za amplifikaciju malog broja target kopija u visokim koncentracijama DNK. Povećana senzitivnost i specifičnost u amplifikaciji čine

ovaj enzim idealnim u ovoj vrsti eksperimenata. Enzim se aktivira samo na temperaturi između 94 i 95°C, tako da je pre početka PCR reakcije obavezna pre-PCR inkubacija 5-10 minuta na ovoj temperaturi. Za to vreme oko 40% enzima pređe u aktivnu formu što je dovoljno velika količina enzima da omogući efikasnu amplifikaciju u početnim ciklusima kada su target sekvence malobrojne, čak i onih kojih ima veoma malo. Prvi ciklusi su ključni za finalni rezultat PCR reakcije. U svakom sledećem ciklusu (na temperaturi denaturacije DNK) permanentno se aktivira nova količina enzima prateći na taj način povećanje target sekvenci, što omogućava optimalnu PCR reakciju. Za AmpliTaqGold polimerazu se preporučuje 25-35 ciklusa PCR-a kao optimum za njenu aktivnost. Smatra se da ona uspešno može da amplifikuje 10 kopija targeta. Njena prednost je velika u odnosu na klasičnu AmpliTaq polimerazu u pogledu specifičnosti i efikasnosti amplifikacije (što smo i mi potvrdili), a rezultati su veoma reproducibilni. Na slici 45 je predstavljen eksperiment sa paralelnom amplifikacijom rekombinovanih molekula enzimima AmpliTaq i AmpliTaqGold.



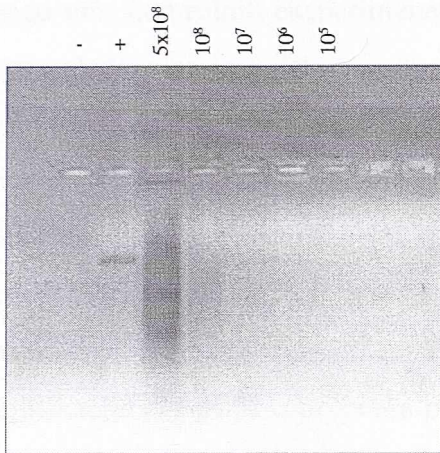
Slika 45. Paralelna amplifikacija P11xP16 enzimima AmpliTaq i AmpliTaqGold sa tri različite dilucije hromozomalne DNK iz soja P3478

Kao što je već rečeno, planirali smo dve serije eksperimenata: u jednoj smo detektovali prisustvo samo mutiranih molekula, a u drugoj smo simultano detektovali i normalne i mutirane molekule (multipleks PCR). Naša osnovna ideja je bila zasnovana na tome da u seriji opadajućih koncentracija hromozomalnih

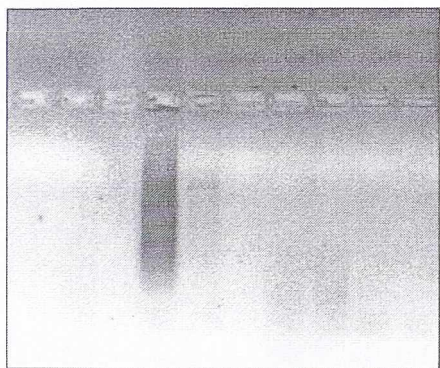
DNK (iz sojeva W3110 i P3478) pratimo prisustvo mutantne trake. U probnim eksperimentima smo pokazali da u 500 ng DNK, što odgovara broju od 10^8 kopija hromozoma, postoji mutantna traka kod oba soja tako da smo seriju opadajućih dilucija hromozomalnih DNK za faktor 10 počeli od 10^8 kopija genoma. U svim eksperimentima kvantifikacije smo koristili standardno napravljenu seriju dilucija DNK od 10^8 do 10^5 kopija genoma, jer je to opseg u kome smo očekivali da vidimo eventualnu razliku između *polA*⁺ i *polAI* sojeva.

PCR amplifikaciju sa jednim setom prajmera P11xP16 smo najpre probali sa običnom AmpliTaq polimerazom kako bismo testirali njenu efikasnost da na našem model-sistemu amplifikuje retke mutantne molekule i eventualno pokaže razliku u njihovom prisustvu kod *polA*⁺ i *polAI* sojeva. Rezultat je bio negativan. Na slici 46 je prikazan prvi PCR gde se može videti velika nespecifična amplifikacija (5×10^8 genoma) i veoma slaba mutantna traka samo na koncentraciji od 1×10^8 kopija genoma za oba soja (takođe uz pojavu nespecifične amplifikacije). U sekundarnom PCR-u (P13xP18), na slici 47, mutantne trake se vide na koncentracijama od 10^8 i 10^7 kopija genoma kod oba soja, što znači da ne postoji diskriminacija u broju mutiranih molekula.

Eksperiment identičan prethodnom, ali sa enzimom AmpliTaqGold, pokazao se informativnijim. Kako se na slici 48 može videti, u reakciji prvog PCR-a amplifikovana mutantna traka se javlja kod oba soja samo na koncentraciji od 10^8 genoma, veoma jasna i bez ikakvih nespecifičnih amplifikacija. U reakciji sekundarnog PCR-a (slika 49), međutim, mutantna traka se kod soja W3110 uočava na koncentracijama od 10^8 i 10^7 kopija genoma, dok se kod soja P3478 veoma slaba mutantna traka uočava i na koncentraciji od 10^6 kopija genoma. Kako je već rečeno da sekundarni PCR detektuje prisustvo minornih target sekvenci, ovaj sekundarni PCR sa AmpliTaqGold polimerazom je bio indikacija da između *polA*⁺ i *polAI* sojeva postoji razlika u broju mutiranih (rekombinovanih) molekula. Međutim, AmpliTaqGold polimeraza u prvom PCR-u nije se pokazala efikasnom da detektuje tu razliku u broju mutiranih molekula između dva soja.

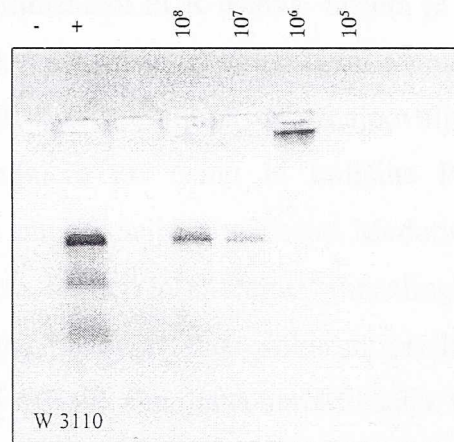


W 3110

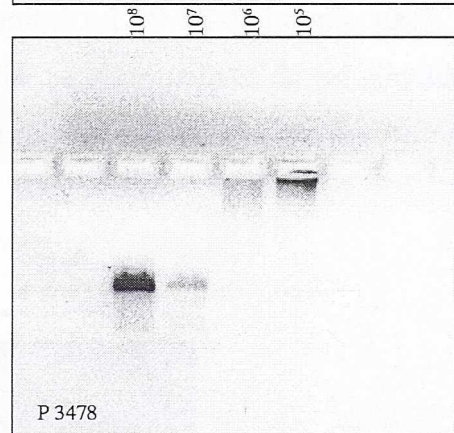


P 3478

Slika 46. PCR' (P11xP16) sa hromozomalnim DNK iz sojeva W3110 i P3478 enzimom AmpliTaq

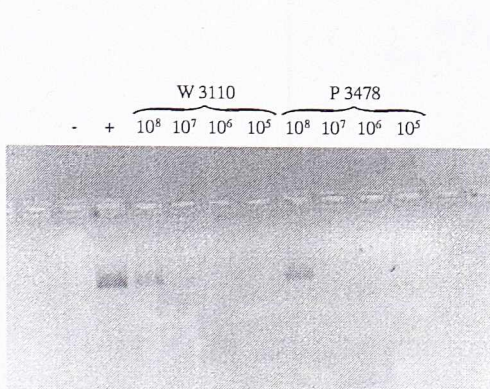


W 3110

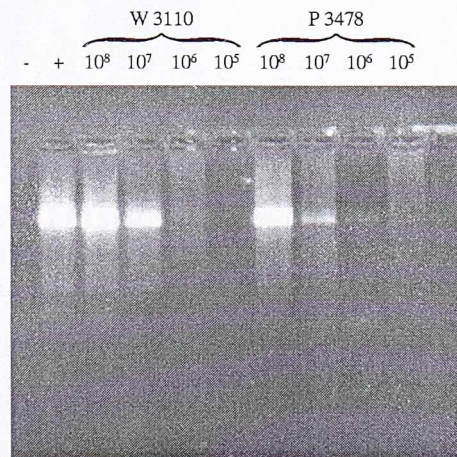


P 3478

Slika 47. PCR'' (P13xP18) sa hromozomalnim DNK iz sojeva W3110 i P3478 enzimom AmpliTaq

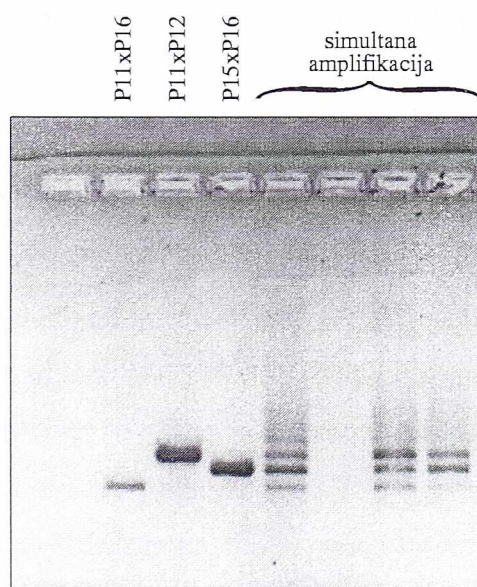


Slika 48. PCR' (P11xP16) sa hromozomalnim DNK iz sojeva W3110 i P3478 enzimom AmpliTaqGold



Slika 49. PCR'' (P13xP18) sa hromozomalnim DNK iz sojeva W3110 i P3478 enzimom AmpliTaqGold

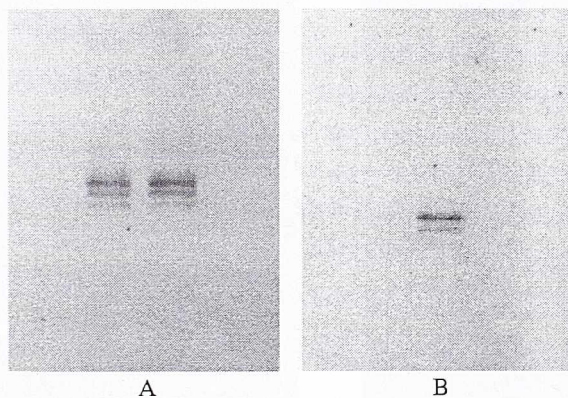
Seriya eksperimenata zasnovana na multipleks PCR metodi zahtevala je mnogo više kontrolnih eksperimenata za optimizaciju PCR uslova. Sistem je bio veoma složen jer je u isto vreme imao i kvantitativni i kompetitivni karakter. Najkritičniji faktor u optimizaciji ovog PCR-a bio je određivanje najpovoljnije “annealing” temperature za sva četiri prajmera pri čemu bi količine PCR produkata bila dovoljno velike a nespecifične amplifikacije eliminisane. Međutim, i ostali faktori su bili varirani: količina prajmera, broj ciklusa, vreme “annealing”-a, vreme ekstenzije (ovi rezultati nisu prikazani). Na slici 50 su prikazani produkti amplifikacije sva tri para prajmera posebno i njihova simultana amplifikacija. Ovi rezultati su dobijeni na “annealing” temperaturi od 69 °C koju smo uzeli kao najoptimalniju pri testiranju prajmera. Na slici se jasno uočava da pri simultanoj amplifikaciji dolazi do pojave nespecifičnih produkata PCR-a.



Slika 50. PCR amplifikacije P11xP16, P11xP12 i P15xP16 (odvojeno i simultano) na hromozomalnoj DNK iz soja P3478 enzimom AmpliTaqGold

Nespecifične produkte smo uspeli da eliminišemo povećanjem temperature “annealing”-a: na 70 °C delimično i na 71 °C potpuno. Ovo je prikazano na slici 51. Međutim, na ovim višim temperaturama je dolazilo do znatne redukcije količine PCR produkta, a povećanje broja PCR ciklusa preko 30 davalo je nespecifične amplifikacije. Na osnovu brojnih kontrolnih eksperimenata sa

variranjem različitih faktora, odlučili smo da PCR uslove standardizujemo na 30 ciklusa, “annealing” temperaturi od 69 °C i redukovanom vremenu ekstenzije od 45 s, uz izvesnu nespecifičnu amplifikaciju koja se u ovako složenim sistemima može tolerisati.

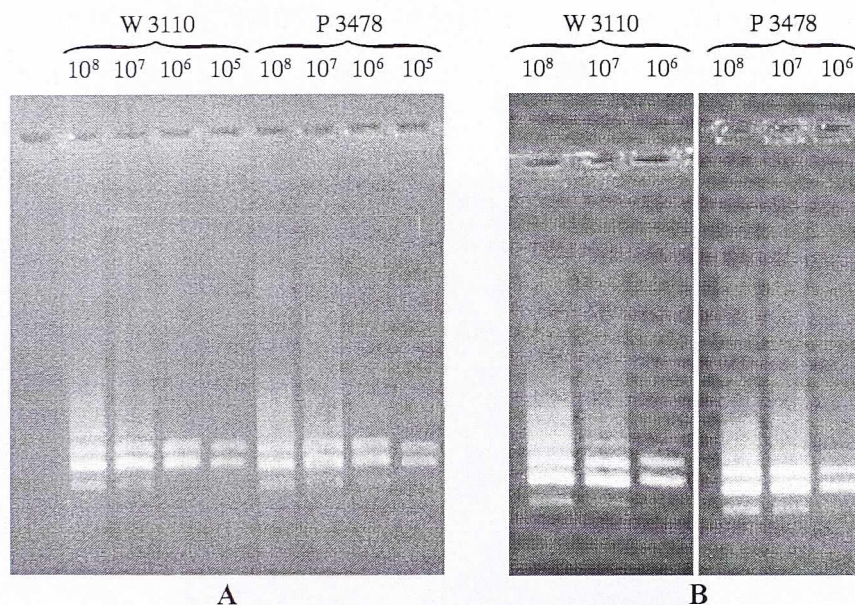


Slika 51. Multipleks PCR na temperaturi od 70°C (A) i 71°C (B)

4.7.3. Utvrđivanje razlike u frekvenci rekombinacije između divljeg soja i *polA1* primenom metode multipleks PCR-a

U ovako optimiziranim uslovima, PCR reakcijama smo podvrgli hromozomalne DNK iz sojeva W3110 i P3478 kao i u ranijim eksperimentima, u koncentracijama od 10^8 do 10^5 kopija genoma. Na slici 52 se može pratiti simultana amplifikacija sva tri fragmenta, od kojih su prva dva amplifikovani nativni IS5 elementi, a poslednja traka, čiji je intenzitet mnogo slabiji u odnosu na prve dve trake je mutantna traka, odnosno rekombinovani IS5 element. Sa opadanjem koncentracije DNK opada i intenzitet mutantne trake, pri čemu se jasno uočava razlika u njenom prisustvu između sojeva *polA*⁺ (W3110) i *polA1* (P3478). Mutantna traka se kod W3110 soja može pratiti do koncentracije DNK od 10^7 kopija genoma, dok se kod P3478 soja mutantna traka pojavljuje i u koncentraciji DNK od 10^6 kopija genoma. Dakle, ovi PCR rezultati su pokazali da je u *polA1* soju povećan broj mutiranih molekula u odnosu na divlji soj i da se ta

razlika uočava detektovanjem mutiranih molekula između dve koncentracije DNK koje odgovaraju broju genoma od 10^7 i 10^6 , dakle za faktor 10.

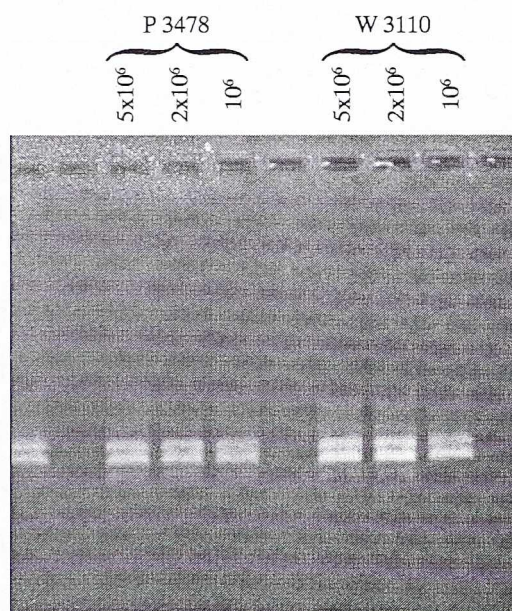


Slika 52. Multipleks PCR sa opadajućim dilucijama hromozomalnih DNK iz sojeva W3110 i P3478 ($10^8 - 10^5$ kopija genoma)
A i B - dva nezavisna eksperimenta

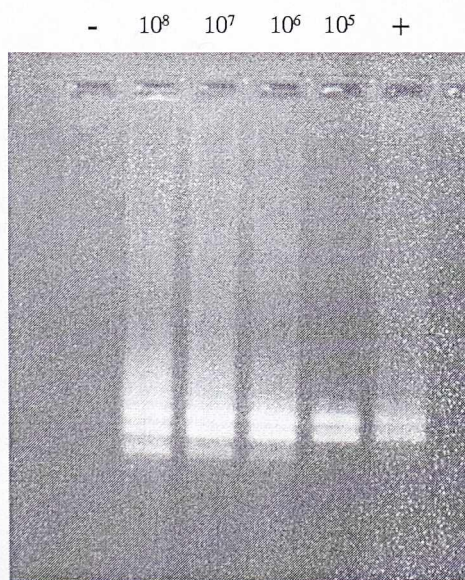
U dodatnom eksperimentu, da bismo eventualno bliže odredili razliku u količini rekombinovanih molekula između ova dva soja, napravili smo manja razblaženja DNK (dva puta i pet puta) između koncentracija 10^7 i 10^6 kopija genoma oba soja i ponovili PCR. Na slici 53 se može uočiti prisustvo mutantne trake veoma slabog intenziteta na obe dodatne dilucije za faktor 2 i za faktor 5. Na osnovu ovih dodatnih rezultata može se reći da se razlika u broju mutiranih molekula između sojeva *polA1* i *polA*⁺ može detektovati između 2×10^6 i 10^6 kopija genoma, odnosno da je broj rekombinovanih molekula dva puta povećan u *polA1* soju u odnosu na divlji soj. Dakle, frekvenca rekombinacije je dva puta povećana u *polA1* soju.

S obzirom na poznatu zajedničku osobinu *pol*, *dam* i *lig* mutanata da pokazuju hiper-Rec fenotip, odnosno, da je kod njih frekvenca rekombinacije povećana usled povećane akumulacije jednolančanih prekida (Konrad, 1977), pokušali smo da našu PCR metodu primenimo u detekciji hromozomalnih

rearanžmana između IS5 i kod ovih bakterijskih sojeva. Odabrali smo soj GM215 koji nosi *dam* mutaciju. PCR je ponovljen kao u prethodnom eksperimentu sa sojevima W3110 i P3478 i rezultati amplifikacije su prikazani na slici 54.



Slika 53. Multipleks PCR sa hromozomalnim DNK iz sojeva W3110 i P3478 (dilucije za faktor 2 i faktor 5)

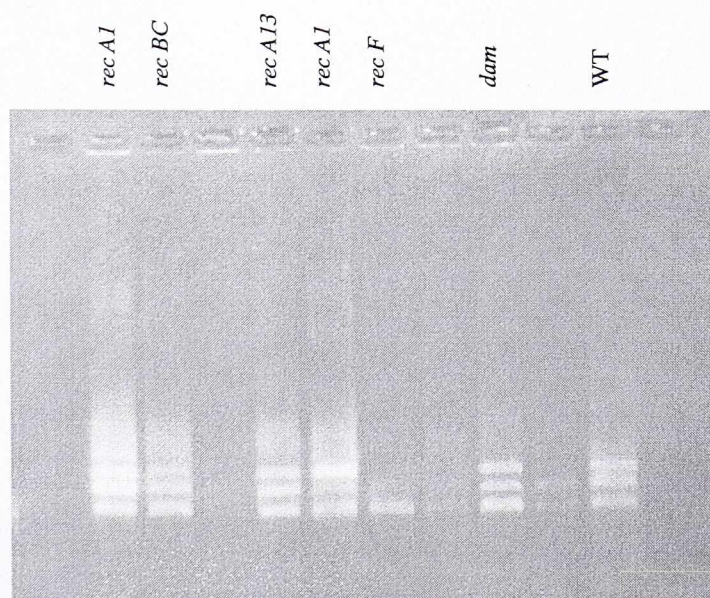


Slika 54. Multipleks PCR sa opadajućim dilucijama hromozomalne DNK iz *dam* mutanta ($10^8 - 10^5$ kopija genoma)

Slika je identična kao u slučaju *polA1* mutanta, dakle, prisustvo mutantne trake se uočava do koncentracije DNK od 10^6 kopija genoma. Prema našim rezultatima PCR-a *pol* i *dam* mutanti se ponašaju identično pokazujući povećanu frekvencu rekombinacije u odnosu na divlji soj.

4.8. UTVRĐIVANJE *recA* ZAVISNOSTI REKOMBINACIJE IZMEĐU DVE IS5 SEKVENCE PRIMENOM METODE PCR-A

Metodu multipleks PCR-a primenili smo za testiranje procesa rekombinacije između dve IS5 na *recA*-zavisnost, odnosno na zavisnost ovog rekombinacionog događaja od homologe rekombinacije koji se odvija uz učesće RecA proteina. U ovom eksperimentu smo testirali nekoliko sojeva *E.coli* koji su mutanti za različite puteve homologe rekombinacije. Ovde je urađena po jedna PCR reakcija za svaki soj sa količinom DNK koja je odgovarala broju genoma od 10^8 . Na slici 55 se može uočiti prisustvo mutantne trake u svim sojevima koji nose *rec* mutacije isto kao i u divljem soju, što ukazuje da proces rekombinacije nije



Slika 55. Multipleks PCR sa hromozomalnim DNK iz sojeva koji nose različite *rec* mutacije (10^8 kopija genoma)

redukovan u ovim sojevima i da se on odigrava nezavisno od homologe rekombinacije i RecA proteina. Drugim rečima, velike delecije koje smo analizirali i koje nastaju rekombinacijom između dva IS5 elementa su *recA*-nezavisni događaji. Ovaj podatak je u saglasnosti sa podacima iz literature prema kojima su procesi rekombinacije u kojima učestvuju IS elementi *recA*-nezavisni događaji.

DISKUSIJA

USUS EST MAGÍSTER ÓPTIMUS ERÉGIUS. (*Ciceron*)

Iskustvo je najbolji učitelj.

MÁXIMA ENIM EST HÓMINUM SEMPER PATIÉNTIA VIRTUS. (*Caton*)

Strpljenje je uvek najveća vrlina čovekova.

5. DISKUSIJA

Istraživanje molekularnih mehanizama mutageneze predstavlja jednu od najfundamentalnijih oblasti u molekularnoj genetici prokariota, jer u osnovi ovakvih studija leži izučavanje procesa replikacije, rekombinacije i reparacije. Ovaj rad predstavlja završni deo naše originalne studije iz oblasti *polA1* indukovane mutageneze koja je pokazala veoma snažan mutatorski efekat ovog alela u histidinskom operonu hromozoma *E.coli* (Savić and Romac, 1982). Analizom velike grupe histidinskih mutanata na nivou primarne strukture DNK u našem prethodnom radu (Janković et al., 1990; Janković, 1990; Kostić, 1990) pokazali smo mehanizam nastajanja *polA1* indukovanih malih delecija po modelu Streisinger-a (Streisinger et al., 1966). Ovaj rad bavi se analizom druge specifične kategorije histidinskih mutacija nazvanih velike delecije (*his-gnd*), koje su, kako smo pokazali u ovom radu, nastale kao rezultat rekombinacije posredovane insercionim sekvencama IS5.

Poznato je da *polA* mutanti *E.coli* K-12 akumuliraju Okazakijeve fragmenate i druge jednolančane prekide i praznine na DNK lancu. Okazaki je demonstrirao (Okazaki et al., 1971) da je kod *polA1* mutanata procesovanje Okazakijevih fragmenata u novorepliciranom lancu DNK deset puta sporije u poređenju sa *polA*⁺ sojem. Po njemu, uzrok povećane frekvence nastajanja delecija u *polA1* sojevima je nagomilavanje jednolančanih prekida i praznina u ćeliji, kao i povećana nestabilnost sekundarne strukture DNK (Okazaki et al.,

1971; Yutaka and Kondo, 1972). Nije isključeno da u ovakvom fiziološkom stanju u ćeliji mogu nastati i neki slučajni dvolančani prekidi na molekulu DNK.

U svakom slučaju, povećano prisustvo prekida i praznina u DNK lancu predstavlja potencijalna mesta za generisanje mutacija. S jedne strane, u literaturi je poznato (Streisinger et al., 1966; Ripley, 1990) da prekidi na DNK lancu u blizini monotonih i repetitivnih sekvenci daju mogućnost za proklizavanje lanca na tim mestima, i igraju veoma važnu ulogu u spontanoj mutagenezi povećavajući šansu za nastanak delecija i vanfaznih mutacija. S druge strane, povećano prisustvo prekida i praznina u DNK lancu znači i povećanu koncentraciju tzv. "slobodnih", odnosno "rekombinogenih" krajeva DNK koji mogu favorizovati proces rekombinacije (Smith, 1983). Ovako povećana frekvencija rekombinacije može biti izražena kroz hiper-Rec fenotip, što je takođe svojstveno *polA1* mutantima (Smith, 1983; Konrad, 1977).

Povećana frekvencija rekombinacije koja se javlja kod *polA1* mutanata prvi put je opisana od strane Konrad-a 1977. godine koji je specijalno konstruisao sistem sa duplikacijom *lac* operona na hromozomu *E.coli*. Zapravo, autor je u ovom sistemu prateći određenu fenotipsku karakteristiku najpre izolovao grupu mutanata koji su pokazivali hiper-Rec fenotip, a u daljoj analizi pokazao je da su to mutanti koji nose mutaciju u strukturnim genima za *polA*, *lig*, *dam* i *dnaS* – dakle, genima koji učestvuju u metabolizmu DNK. Zajednička karakteristika svih ovih mutanata je akumulacija prekida i praznina na DNK lancu, što sugerise da je ta njihova zajednička osobina osnova za promociju hiper-Rec fenotipa. Ova potencijalno "rekombinogena" mesta na hromozomu neki autori nazivaju i rekombinogene lezije (Hays et al., 1980; Korba and Hays, 1980).

Međutim, u kontekstu praćenja rekombinacije u drugim sistemima, kakav je recimo konjugacija i formiranje Hfr "cross"-eva (Glickman and Rutgers, 1979), *polA1* i *lig* mutanti pokazuju izraziti hipo-Rec fenotip gde procenat formiranja Hfr-ova opada i preko 90% u odnosu na divlji soj. Naravno, proces rekombinacije je veoma složen, pa se ova razlika u ponašanju *polA1* mutanata (hiper-Rec/hipo-Rec) osim razlici u eksperimentalnim sistemima (F plazmid, hromozom) može delom pripisati i eventualnoj ulozi ovog enzima u stabilizaciji DNK donora ili

recipijenta, ili možda njegovoj ulozi u transportu DNK. U svakom slučaju, razni vidovi rekombinacije i ušesće različitih složenih rekombinacionih enzimskih sistema u njima imaju mnogobrojne specifičnosti i zahteve u odnosu na mesto i tip rekombinacije.

U ovom radu analizirali smo četiri velike delecije *his-gnd* koje smo nezavisno izolovali iz *polA1* sojeva. Ove delecije nastaju kao posledica rekombinacije između dva IS5 elementa koji su locirani sa obe strane histidinskog operona u istoj orijentaciji, a takva pozicija repetitivnih sekvenci je osnovna pretpostavka za promovisanje delecija. Sve četiri delecije nastaju na isti način – rekombinacijom između dve IS5 sekvence dolazi do ekscizije DNK fragmenta između njih zajedno sa jednim ekvivalentom IS5. Ukupan deletirani fragment iznosi 35 kb, a kao dokaz mutacionog događaja ostaje jedna “rekombinovana” IS5 sekvenca koja sadrži polimorfne nukleotide iz oba IS5 elementa iz kojih je “rekonstruisana”. Sve četiri delecije imaju identične “rekombinovane” IS5, odnosno, pozicije svih 5 polimorfni nukleotida u novonastalim IS5 sekvencama su identične – po jedan nukleotid iz “leve” i četiri nukleotida iz “desne” IS5. Analizom ovog rekombinacionog događaja na nivou sekvence pokazali smo da rekombinacija između dva IS5 elementa uvek prolazi kroz isti segment DNK - kroz njihov levi terminus. Kod spontanih mutanata poreklom iz divljeg soja (*polA*⁺) rekombinovana IS5 sekvenca je identična kao i kod *polA1* sojeva, što sugeriše da ne postoji nikakva specifičnost *polA1* alela u odnosu na mesto prolaska rekombinacije. Frekvencija rekombinacije je povećana u *polA1* i *dam* sojevima koji akumuliraju jednolančane prekide, što je nedvosmisleno potvrđeno primenom tehnologije kvantitativnog PCR-a. Prema našim rezultatima zasnovanim na PCR-u, frekvencija rekombinacije je povećana u *polA1* soju dva puta u odnosu na divlji soj.

Primenom iste tehnologije pokazali smo da se ovaj rekombinacioni događaj odvija na *rec-A* nezavisan način. S obzirom na dužinu homologe sekvence i veličinu delecije ovo izgleda pomalo neobično, ali u literaturi je poznato da se rekombinacioni događaji posredovani transpozonomima i insercionim sekvencama odigravaju *recA*-nezavisnim mehanizmima (Chow, 1977). Isto tako,

poznato je da delecije mogu nastati *recA* nezavisnim mehanizmima (Lovett et al., 1993; Lovett et al., 1994), a prema nekim novijim podacima (Chedin et al., 1994; Lovett et al., 1994) izgleda da se zahtev za RecA proteinom ne povećava sa porastom distance između ponovaka koji se rekombinuju, kako se ranije smatralo.

Među malobrojnim podacima iz literature o *rec-A* zavisnosti nekih rearanžmana (pre svega delecija) i rekombinacija koje promovisu IS elementi, nalazimo da se sve ove funkcije realizuju bez učešća RecA proteina, odnosno *rec-A* nezavisnim mehanizmima. Naši rezultati o *rec-A* nezavisnom nastajanju velikih delecija između IS5 elemenata u skladu su sa postojećim podacima da insercione sekvence IS1, IS5, IS50, IS3411 (Braedt, 1985; Ishiguro and Sato, 1984; Phadnis and Berg, 1985; Timmons and Deonier, 1986) i repetitivna sekvenca RS1 (Goldberg and Mekalonos, 1986) vrlo efikasno promovisu delecije i u *recA*⁺ i u *recA*⁻ ćelijama. Svi pomenuti IS elementi izuzev IS1, međusobno se rekombinuju nezavisno od svojih genskih produkata. IS1 predstavlja kuriozitet koji za rekombinaciju zahteva svoj IS1-kodirani genski produkt (Braedt, 1985), ali će u kasnijem delu diskusije ovaj izuzetak IS1 elementa biti prokomentarisani i na drugi način. Svi pomenuti sistemi za praćenje rekombinacije su bili konstruisani na plazmidima, odnosno na λ fagu (IS5) (Timmons and Deonier, 1986).

Jedinu komparativnu studiju koja prati formiranje delecija na plazmidu i na hromozomu putem rekombinacije između homologih sekvenci, dao je Lovett (Lovett et al., 1993). On je kao repetitivne (homologe) sekvence koristio segment od 787 bp, što spada u dugačke regione homologije, i pokazao da se rekombinacioni događaj koji vodi formiranju delecija odvija na *recA*-nezavisan način i sa istom efikasnošću na plazmidu i na hromozomu. U ovakvim vrstama analize prednost je imati izolovane spontane delecije na hromozomu jer su one mnogo relevantniji sistem za studiju mutacionih događaja. Naš model delecija na hromozomu i pomenuti rad Lovett-a pokazuju da se rekombinacija između dugačkih ponovaka na hromozomu može odvijati *recA* nezavisnim mehanizmom.

U cilju izučavanja mehanizama nastajanja delecija i brojnih parametara koji ih karakterišu, napravljeni su različiti konstrukti na plazmidima koji će biti dalje diskutovani. Komparativna analiza (Dianov et al., 1991; Mazin et al., 1991)

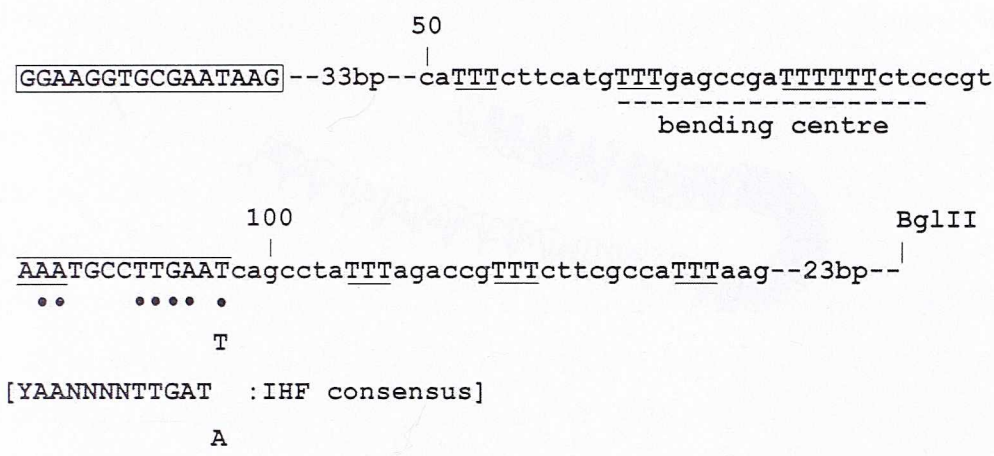
urađena na seriji specijalno konstruisanih plazmida demonstrirala je da delecije nastaju na *recA*-nezavisan način i u slučaju kraćih (21, 31, 42 bp) i u slučaju dužih (165, 401 bp) ponovaka.

Drugi veoma zanimljiv podatak o učešću RecA proteina u formiranju delecija dali su nezavisno jedan od drugog Chedin (Chedin et al., 1994) i Lovett (Lovett et al., 1994). Ovi autori su pokazali da frekvenca nastajanja delecija između ponovaka od 18 bp (Chedin et al., 1994), odnosno 101 bp (Lovett et al., 1994), opada sa porastom distance između njih, što je realno očekivati jer se smanjuje šansa za kontakt među ponovcima. Na primer, sa porastom distance od 33 do 2313 bp, frekvenca nastajanja delecija opada preko 1000 puta (Chedin et al., 1994). Ali, ono što je neočekivano, a demonstrirano je nezavisno od oba pomenuta autora, jeste da nije uočen nikakav efekat *recA* na frekvencu delecija na bilo kojoj distanci između ponovaka (svaki konstrukt je paralelno testiran u *recA*⁺ i *recA*⁻ ćelijama). To znači da je ovim eksperimentima eliminisana mogućnost da RecA protein obavezno učestvuje u procesima rekombinacije između udaljenih homologih ponovaka kako se do skora smatralo i kako se može sresti u literaturi od pre više godina. Chedin daje iste podatke za θ plazmid i za hromozom *B.subtilis*. Priključujući ovome rad Lovett-a i naš rad o *recA*-nezavisnom formiranju delecija na hromozomu *E.coli*, postavlja se pitanje da li se može generalizovati da je formiranje delecija nezavisno od RecA proteina kao sinonima homologe rekombinacije?

Poznato je da insercione sekvence, osim svoje osobine transpozabilnih elemenata (autonomni ili kao delovi kompozitnih transpozona) predstavljaju i izvanredne supstrate za homologu rekombinaciju, pa je njihovo učešće kao repetitivnih sekvenci u genomu vrlo važno u procesima mutageneze. Dužine IS5 sekvenci od 1195 bp predstavljaju regione homologije koji su učesnici rekombinacije, ali, kako je naša analiza "rekombinovanih" IS5 sekvenci pokazala, rekombinacioni događaj se odigrava uvek u vrlo definisanom segmentu tog regiona, u levom terminusu IS5. Da li je ta sekvenca ono što determiniše rekombinaciju pošto su svi nezavisno izolovani deletanti iz *polA1* i iz divljeg soja nastali na isti način?

Poznato je još iz vremena klasične molekularne genetike *E.coli* iz kasnih sedamdesetih godina (Chow,1977; Chow and Broker, 1978) da je IS5 sekvenca veoma deletogena i da posebno njen levi terminus predstavlja "hot spot" u mnogim rekombinacionim događajima koji generišu delecije. U to vreme sekvenca i strukturne karakteristike IS5 još uvek nisu bile poznate. Mnogo godina kasnije, među većim brojem studija (Koo et al., 1986; Lilley, 1986; Ulanofski and Trifonov, 1987) koje su se bavile strukturom DNK molekula u smislu njegove konformacije i zakrivljenosti uslovljene primarnom strukturom, kao i odnosom tih lokalnih struktura i nekih funkcija, pojavila se studija japanskih autora (Mizuno,1987; Muramatsu et al., 1988) koja je u ovom kontekstu dala neke veoma važne strukturne karakteristike IS5 sekvence (Uvod, str. 15). Na osnovu našeg praktičnog iskustva da smo u radu imali dosta problema sa nestabilnošću izvesnih klonova i na osnovu karakteristika koje su izneli ovi autori, mogli smo da anticipiramo eventualno mesto prolaska rekombinacije, što se prema našim rezultatima kasnije ispostavilo ispravnim.

Na slici 56 je prikazan levi terminus IS5 od 157 bp koji uključuje i invertovani ponovak od 16 bp. Obeleženi su boksovi dA i dT, centar zakrivljenja (bending centre) kao i mesto vezivanja IHF faktora. Poznato je da blokovi $[dA]_n$ i $[dT]_n$ (gde je broj nukleotida u boksovima 3-5) koji su u fazi heliksa, dovode do zakrivljenja segmenta DNK (Koo et al., 1986; Lilley, 1986; Snyder et al., 1986; Ulanofski and Trifonov, 1987). Osim ovog zakrivljenja uzrokovanog samom sekvencom, na levom terminusu se nalazi i konsenzus sekvenca za vezivanje IHF proteina, koji, vezujući se za DNK, dovodi do njenog savijanja za ugao od 180° (Thompson and Landy, 1988; Rice et al., 1996). Mesto vezivanja IHF faktora se najčešće nalazi u AT bogatim sekvencama kakav je slučaj i ovde. Dakle, vezivanjem IHF faktora za već "prirodno" zakrivljenu sekvencu verovatno dolazi do velikog savijanja i deformacije na tom delu, što karakteriše levi terminus IS5 elementa.

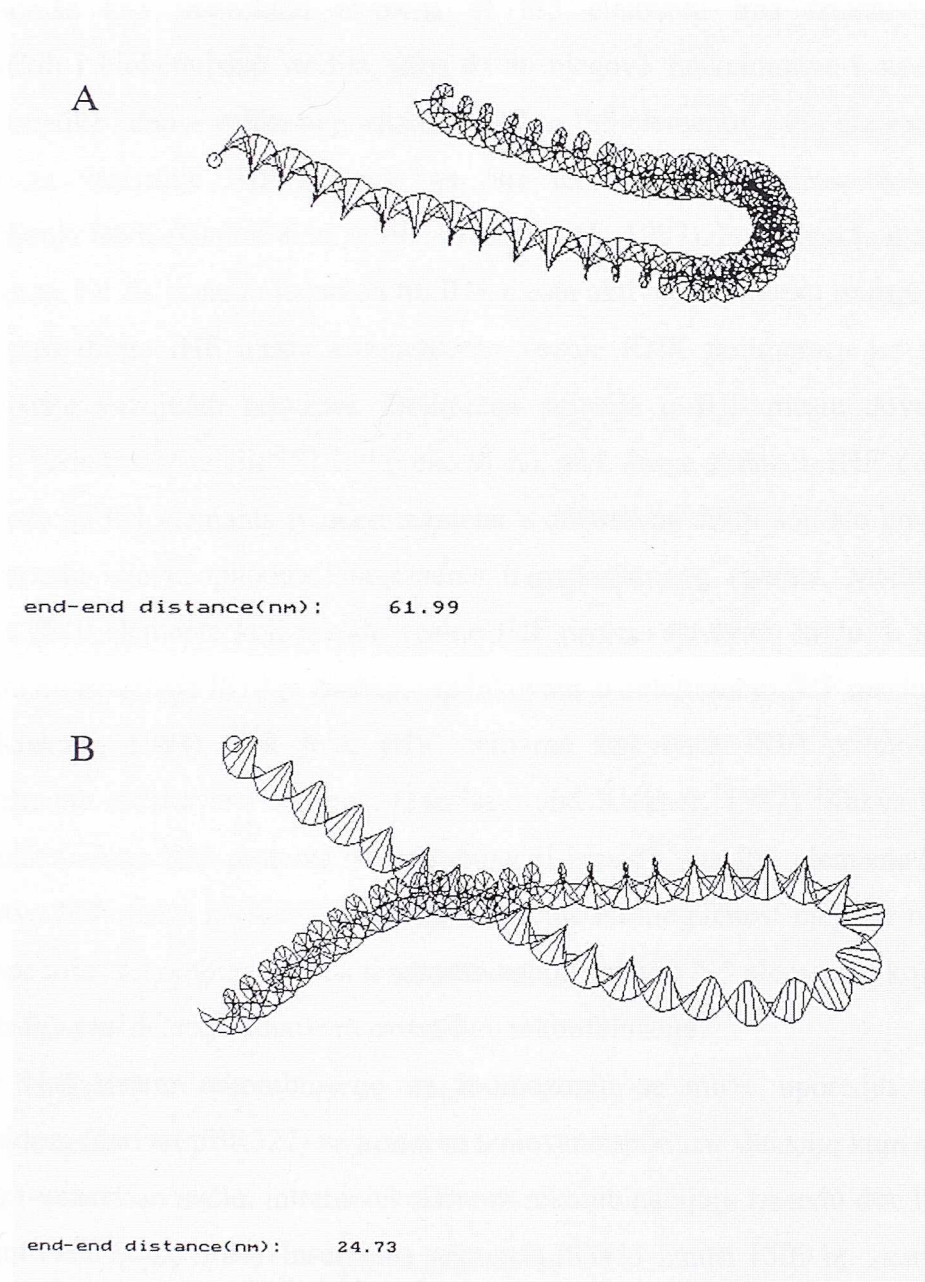


Slika 56. Primarna struktura levog terminusa IS5 elementa
(Muramatsu et al., 1988)

Mi smo primenili jedan kompjuterski program (Dlakić and Harrington, 1998) specijalno napravljen za simulaciju takvih DNK struktura koji je prikazan na slici 57. Tu su prikazane dve konstelacije levog terminusa IS5: jedna je sekvenca sa svojim "prirodnim" zakrivljenjem bez vezanog IHF proteina, a druga je sekvenca sa vezanim IHF proteinom koji je dodatno savija. Na ovim simuliranim modelima se može uočiti veoma lepo efekat interakcije IHF proteina sa DNK.

Zašto je ovako zakrivljena struktura DNK sa IHF proteinom važna?

Pre svega, ključni događaj u nastajanju ovih delecija je dovođenje u kontakt dve IS5 sekvence koje su međusobno udaljene na hromozomu. Velika je verovatnoća da savijanjem DNK za 180° IHF protein doprinosi ostvarenju kontakta dva udaljena segmenta. Pored IHF mesta, na IS5 sekvenci su detektovana i dva mesta za vezivanje Fis proteina (Galas and Chandler, 1989) koji takođe može da savija DNK za 90° (Gille et al., 1991; Thompson and Landy, 1988). S obzirom da o tome ništa više ne znamo, to bi mogao biti samo predmet spekulacije. Osim vezivanja za DNK, poznato ja da IHF protein ima i veliki afinitet za kooperativno vezivanje sa drugim proteinima (Friedman, 1988), pa je realno pretpostaviti da se na ovom mestu može formirati neki visoko-uređeni nukleoproteinski kompleks za rekombinaciju.



Slika 57. Zakrivljena struktura levog terminusa IS5: (A) bez vezanog IHF proteina; (B) sa vezanim IHF proteinom

Podaci o funkcionalnim karakteristikama vezanim za samu strukturu IS elemenata su veoma oskudni, nešto više se može sresti za neke IS elemente koji ulaze u sastav kompozitnih transpozona kao što su IS1, IS50, IS10, IS3 (Galas and Chandler, 1989), jer su interesantni sa aspekta njihovih aktivnosti vezanih za transpoziciju. IS5 element ne ulazi u sastav nijednog transpozona u *E.coli*, on

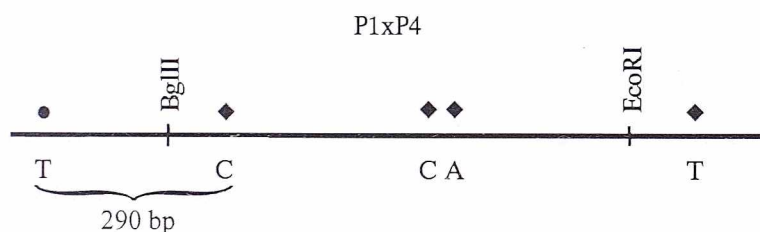
funkcionira kao samostalni element. O IS5 elementu ima izuzetno malo genetičkih i biohemijskih studija, tako da su njegove funkcionalne i strukturne karakteristike i danas velika nepoznanica. Slično IS5 elementu, i IS1 element ima mesto za vezivanje IHF proteina na oba termina na kojima dolazi do zakrivljenja DNK (Gamas et al., 1987; Prentki et al., 1987). Pokazano je u *in vitro* sistemu sa IS1 da je samo jedno od tih IHF mesta aktivno u procesu transpozicije, dok se za drugo IHF mesto kompetitivno vezuje RNK polimeraza jer postoji preklapanje vezujućih sekvenci. Delimična delecija u IHF mestu dovodi do velikog pada transpozicije IS1 (od preko 90%), ali s druge strane, u IHF⁻ ćelijama transpozicija IS1 elementa je nepromenjena u odnosu na divlji soj, što govori da IHF protein nije neophodna komponenta transpozicionog aparata. Međutim, u slučaju IS10 elementa koji takođe vezuje IHF protein na svom kraju, u *in vivo* sistemu transpozicija IS10 je značajno redukovana u deletiranom IHF mestu (Way and Klekner, 1984), dok je u IHF⁻ ćelijama frekvencija IS10 promovisanih rearanžmana redukovana 5-9 puta (Morisato and Klekner, 1987). Kakva bi bila eventualna uloga IHF proteina u rekombinaciji između dva IS5 elementa? Da li prisustvo IHF mesta na levom terminusu upućuje na mogućnost njegove uloge u "site specific" rekombinaciji i da li rekombinacija između IS5 elemenata kojom su nastale *his-gnd* delecije odgovara ovom tipu rekombinacije?

Naš sistem rekombinacije na hromozomu se može uporediti sa Cit plazmidom (derivat pBR322) na kome su izolovane spontane delecije koje nastaju na *recA*-nezavisan način, intramolekularnom rekombinacijom između dve IS3411 (Ishiguro and Soto, 1984). Inerciona sekvenca IS3411 iznosi 1309 bp i zanimljiv je podatak da za rekombinaciju između dve IS3411 koje promovišu deleciju nije neophodna intaktna IS, pa autori smatraju da ovoj rekombinaciji posreduje neka interna "site specific" rekombinacija. Na osnovu delecionih derivata i konstelacije restrikcionihih fragmenata bilo je jasno da se i pored dugačke homologije od 1309 bp rekombinacija odvija preko neke "site" specifične sekvence koja je locirana na levom kraju elementa. Drugih detalja nema, ali danas znamo iz literature da IS3411 takođe ima sekvencu za vezivanje IHF faktora na tom segmentu kao već pomenuti IS1 i IS5 (Galas and Chandler, 1989). Ova rekombinacija između

IS3411 elemenata po svojim karakteristikama bi mogla biti ista kao kod IS5 elemenata jer sugerije na neki specifičan segment DNK koji je odgovoran za rekombinaciju.

Podaci o IS1 elementu takođe bi mogli ići u prilog našoj pretpostavci o ulozi IHF proteina u rekombinaciji između IS. Već je pomenuto (Braedt, 1985) da IS1 elementi pri rekombinaciji koja se odigrava na *recA*-nezavisan način zahtevaju prisustvo IS1-kodiranog faktora, odnosno, da je njihova rekombinacija IS1-katalizovana. Autor je pratio rekombinaciju između intaktnih IS1 elemenata i između IS1 elemenata kojima je bio deletiran desni terminus. Kod deletiranih IS1 elemenata rekombinacija je izostala, što su autori interpretirali kao nedostatak IS1 kodiranog proteina neophodnog za proces rekombinacije. Jer, delecijom desnog termina bio je uništen jedan promotor i narušen jedan "reading frame". Mogućnost da je delecijom bilo uništeno mesto neophodno za rekombinaciju, autor je odbacio kao veoma malo verovatnu. U to vreme nije bilo poznato da IS1 sekvenca vezuje IHF protein za svoje krajeve. Kasnije, u jednoj seriji studija koju je dala druga grupa autora (Gamas et al., 1987; Prentki et al., 1987), pokazano je da IS1 vezuje IHF protein na oba termina, pri čemu desni kraj učestvuje u procesu transpozicije. Delecionim derivatima desnog termina, autori su demonstrirali direktnu korelaciju između vezivanja IHF proteina i transpozicione aktivnosti IS1. Dakle, osvrćući se na prethodno pomenuti rad o IS1, delecijom desnog termina IS1 bi došlo do gubitka mesta za vezivanje IHF proteina, usled čega bi rekombinacija između dva IS1 elementa izostala – to bi bilo naše tumačenje rezultata u svetlu današnjeg poznavanja nekih osobina IS elemenata. Prema tome, može se zaključiti da IS1 rekombinacija nije IS1-katalizovana, već da je ključni faktor prisustvo IHF proteina. Uključujući i naše rezultate o rekombinaciji između IS5, izgleda da je IHF protein, odnosno kompleks DNK-IHF protein, ključni korak u rekombinaciji (rekombinogeni kompleks). Na osnovu malog broja studija o rekombinaciji između IS elemenata kao regiona homologije, gde svrstavamo i naš rad, zasada se može smatrati da se rekombinacija odvija *recA*- nezavisnim mehanizmima i bez učešća IS kodiranih funkcija. Suprotno ovome, transpozicija je uvek zavisna od IS kodiranih funkcija.

Sekvenciranjem *his-gnd* deletanata, tj. rekombinovane IS5 sekvence, jasno smo pokazali da rekombinacija prolazi kroz levi terminus. Koliki je deo tog segmenta neophodan za proces rekombinacije i da li se može govoriti o nekoj funkcionalnoj “core” sekvenci? Japanski autori su definisali veliko zakrivljenje ovog segmenta dužine 157 bp. Prema našoj nukleotidnoj sekvenci rekombinovenog IS5 elementa rastojanje između dva najbliža polimorfna nukleotida koji potiču iz različitih IS5 elemenata iznosi 290 bp (tu ulazi i pomenutih 157 bp), slika 58.



Slika 58. Raspored polimorfnih nukleotida na rekombinovanoj IS5

Teorijski, to bi bila najveća dužina segmenta IS5 na kojoj je moglo doći do rekombinacije, i ostaje pitanje gde je tačno na tom delu molekula došlo do prekida i spoja. S obzirom na to da levi terminus ima mesto za vezivanje IHF proteina, postoji dobar argument za pretpostavku o ulozi IHF proteina u rekombinaciji, tj. u formiranju ovih delecija. Svi naši rezultati ukazuju da se rekombinacija između dva IS5 elementa odvija po tipu “site specific” rekombinacije. Očigledno je da se ona dešava u vrlo determinisanoj sekvenci, a s druge strane, vrlo verovatno učešće IHF proteina kao sinonima za “site specific” rekombinaciju takođe govori u prilog tome.

Naravno, direktan dokaz “site specific” rekombinacije bi bio odsustvo rekombinacije između IS5 elemenata kojima je deletiran levi terminus. U tom slučaju, skraćivanjem tog segmenta i mutacijom sekvence za vezivanje IHF proteina bi se preciznije mogla definisati neophodna dužina homologog segmenta kao zahtev za rekombinaciju, kao i uloga IHF proteina. S obzirom na to da se IHF protein vezuje za već “prirodno” zakrivljeni segment DNK (Muramatsu et al.,

1988), postoji mogućnost da on svojim vezivanjem i dodatnim savijanjem samo povećava efikasnost rekombinacije formirajući određene strukture protein-DNK ili protein-protein-DNK (Friedman, 1988). Isto tako, postoji i mogućnost da se bez učešća IHF proteina rekombinacioni događaj ne bi odigrao. Jer, treba imati u vidu da su homologe sekvence (učesnici u rekombinaciji) veoma udaljene jedna od druge pa bi možda savijanje DNK i učešće IHF proteina bili ključni događaji za kontakt između sekvenci i njihovu rekombinaciju. Našom metodom multipleks PCR-a mogao bi se pratiti proces rekombinacije između IS5 elemenata u IHF⁻ mutantima.

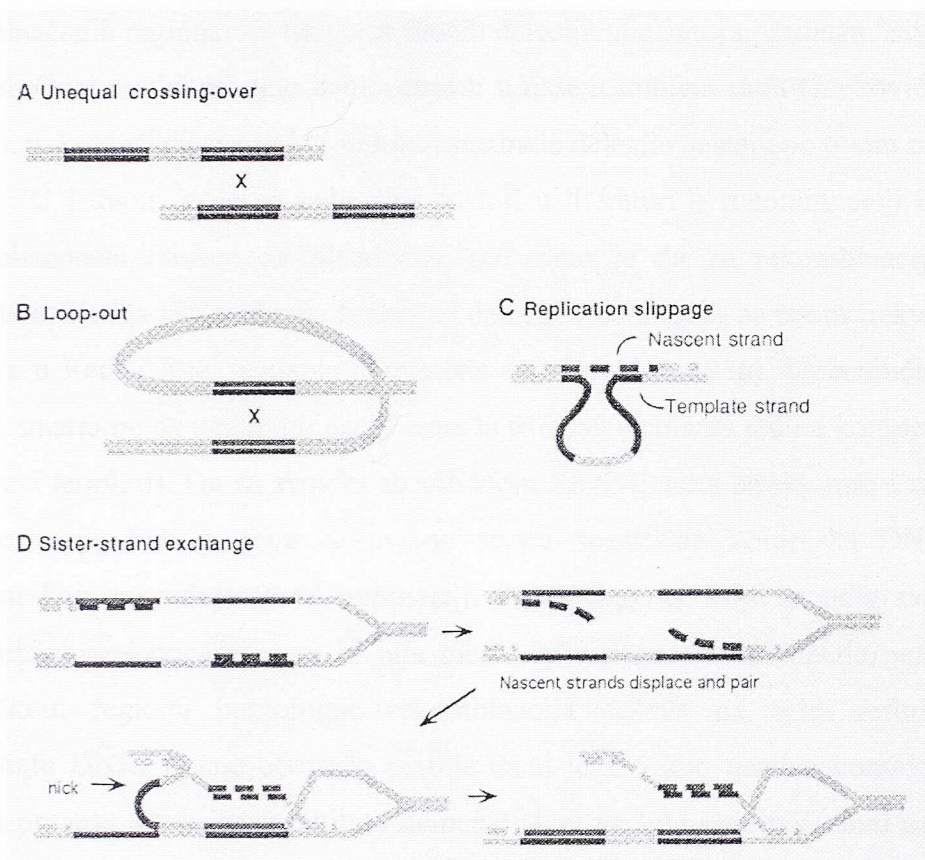
Naši rezultati su pokazali da se rekombinacija između IS5 elemenata koja generiše delecije odvija na *rec-A* nezavisan način. Iako su delecije najviše izučavani genomski rearanžmani u *E.coli*, i pored mnogobrojnih studija o tome, poznavanje samog mehanizma nastajanja delecija i danas je veoma opskurno i diskutabilno. Jedan od razloga je verovatno i taj što postoji više puteva rekombinacije koji su na neki način povezani međusobno (Lloyd and Brooks, 1996; Nash, 1996; Smith, 1987; Smith, 1988). Delecije verovatno nastaju različitim mehanizmima od kojih neki koriste DNK replikaciju a drugi DNK prekide. Repetitivne DNK sekvence su prisutne na krajevima većine delecija (Albertini et al., 1982) i njihovo prisustvo je velika implikacija da “pogrešno sparivanje” ili rekombinacija između njih igra važnu ulogu u mehanizmu nastanka delecija. Pretpostavljeni mehanizmi za kreiranje delecija između dva direktna ponovka mogu se grupisati u tri kategorije (Yang and Masker, 1987). Prva mogućnost je nastanak delecija putem pogrešnog sparivanja ili “slippage”-a između repetitivnih sekvenci (Ripley, 1990; Streisinger et al., 1966). Druga mogućnost je intermolekularna rekombinacija između repetitivnih sekvenci sa različitih DNK molekula (Lovett et al., 1993; Singer and Westlye, 1988). Prema trećem modelu, prekidi na DNK lancu mogu predstavljati interaktivne krajeve između kojih se mogu formirati delecije (Conley et al., 1986; Ehrlich, 1989). Ključni događaj u svakom mehanizmu nastajanja delecija je kontakt između direktnih ponovaka i efikasnost tog kontakta. Naravno, formiranje delecija je u funkciji rastojanja između ponovaka kao i dužine tih ponovaka, tako da sa

povećanjem rastojanja između njih opada efikasnost nastajanja delecija. Prema Chedin-u (Chedin et al., 1994), za ostvarivanje kontakta između ponovaka veoma je važna i sama karakteristika sekvence, tj. njena fleksibilnost ili sklonost ka formiranju sekundarnih struktura. Mnoge delecije se samo delimično mogu objasniti napred navedenim mehanizmima svrstanim globalno u tri grupe. Jedna od najsloženijih kategorija delecija za analizu molekularnih mehanizama njihovog nastanka su velike delecije.

Poznato je da RecA protein promoviše transfer i sinapsu udaljenih homologih regiona u *in vitro* sistemima i da je neophodan *in vivo* u procesu konjugacije. Kako se odigrava rekombinacija između udaljenih ponovaka bez RecA proteina? Na slici 59 šematski je prikazano nekoliko različitih modela nastajanja delecija (Lovett et al., 1994). Ovi modeli odnose se na delecije promovisane repetitivnim sekvencama koje nastaju *recA* nezavisnim mehanizmima.

Delecije koje smo mi izolovali, analizirali i sekvencirali pripadaju tipu ektopičnih genomske rearanžmana jer su promovisane rekombinacijom između veoma udaljenih (dispergovanih) sekvenci IS5, što ima za posledicu deleciju od 35 kb. Dakle, imamo dugačke homologe sekvence (direktne ponovke) na vrlo velikoj distanci, koje se rekombinuju na *recA*-nezavisan način i imaju vrlo karakteristično zakrivljenu strukturu na jednom terminusu koji nosi mesto za vezivanje IHF proteina. Mesto prolaska rekombinacije je upravo ta zakrivljena sekvenca. Kakav bi mogao biti model nastajanja ovih delecija?

Dva pomenuta autora, Chedin i Lovett, koji su dali dve novije studije (Chedin et al., 1994; Lovett et al., 1994) o odnosu: frekvencija nastajanja delecija / dužina rekombinovanih sekvenci / udaljenost između rekombinovanih sekvenci, uočili su jedan interesantan fenomen. Frekvencija rekombinacije opada eksponencijalno sa povećanjem distance između ponovaka jer se smanjuje šansa za kontakt između njih, ali se taj pad odvija u dve faze: rekombinacija naglo opada pri manjim distancama, dok je na većim distancama taj pad mnogo blaži. U radu Chedin-a distanca od 400 bp je kritična. Prema ovome autor smatra da se rekombinacija odvija na dva različita načina u zavisnosti od distance, odnosno, da



Slika 59. Šematski prikaz modela nastajanja delecija *recA* nezavisnim putem (Lovett et al., 1994)

možda postoje dva različita puta za dovođenje direktnih ponovaka u kontakt bez učešća RecA proteina. Po njemu, za delecije do 400 bp mogao bi biti prihvatljiv model "slippage"-a, dok za veće distance ostavlja otvoreno pitanje.

Prema Chedinu, u intramolekularnoj rekombinaciji u *recA*- nezavisnim događajima, fleksibilnost DNK dupleksa i njegova zakrivljenost imali bi veliki značaj u određivanju kontakta između ponovaka. Prema Lovett-u, prednost u nastajanju *recA*-nezavisnih delecija ima model izmene između sestrinskih hromatida pri replikaciji jer on istovremeno daje mogućnost i za intramolekularnu rekombinaciju pošto već sadrži jednolančane regione DNK. Po njemu, delecije mogu nastati kada se ponovci nalaze na jednolančanim regionima pri reparaciji ili u replikativnoj viljušci. Jednolančani regioni mogu favorizovati interakciju između ponovaka i rekombinaciju, pri čemu distribucija jednolančanih delova DNK može biti veoma kompleksna u smislu učestalosti dužih ili kraćih

jednolančanih regiona. Za nastanak kraćih delecija oba autora predlažu "slippage" model. Ovaj model mi smo demonstrirali u našem ranijem radu (Janković et al., 1990), pokazavši da sve *polA1* indukivane male delecije nastaju po ovom modelu.

U jednom jedinom radu koji postoji u literaturi o rekombinaciji između IS5 elemenata (sistem na plazmidu), pokazano je da za rekombinaciju nije potrebna nijedna IS5-kodirana funkcija i da se rekombinacija sa istom frekvencijom dešava u Rec⁺ i Rec⁻ ćelijama (Timmons and Deonier, 1986). Uzimajući i to u obzir, smatramo da u rekombinaciji između dva IS5 elementa jedinu kompetenciju ima levi terminus. On sa svojom specifičnom zakrivljenom strukturom i mestom za vezivanje IHF proteina verovatno stvara specifičan kompleks DNK-IHF protein koji posreduje u rekombinaciji. Po načinu na koji se odigrava ovaj rekombinacioni događaj, ovo bi bila mesto specifična rekombinacija, jer se na dugačkom regionu homologije rekombinacija dešava na vrlo definisanom segmentu DNK. Ostaje otvoreno pitanje da li je IS5 kao nosilac homologije u ovom procesu samo jedan entitet (elemenat) koji na sebi nosi pomenuti segment odgovoran za rekombinaciju, ili je zahtev za većom homologijom neophodan kako bi se ostvario kontakt bez obzira na to što u samom činu učestvuje jedan manji segment, maksimalne dužine 290 bp.

Analizirane delecije u ovom radu su izolovane iz *polA1* mutatorskog soja, ali su to spontani događaji koji se odigravaju i na hromozomu divljeg soja *E. coli*, što smo mi i potvrdili PCR tehnologijom. Evidentno je da je frekvencija mutanata povećana u *polA1* i *dam* sojevima koji akumuliraju jednolančane prekide u odnosu na divlji soj. Koji od mehanizama bi bio prihvatljiv da objasni nastanak velikih delecija koje po svemu sudeći nastaju mehanizmom "site specific" rekombinacije, i kako fiziološko stanje *polA1* ćelija u kojima su akumulirani prekidi i praznine stimuliše ovu vrstu genomskih rearanžmana? S obzirom na povećano prisustvo prekida i praznina u *polA1* i njihovog produženog zadržavanja u ćeliji, svi potencijalni događaji "slippage"-a kao i formiranja kontakata između rekombinogenih sekvenci bili bi favorizovani.

Model "proklizavanja" ("slippage"), čiju osnovu čini greška u replikaciji i "pogrešno" sparivanje repetitivnih sekvenci, nije prihvatljiv za velike delecije,

odnosno za proklizavanje fragmenta DNK između veoma udaljenih homologih sekvenci. Ovaj model ne podrazumeva nikakav “cross” između ponovaka.

Jednolančani regioni sa ponovcima mogu favorizovati interakcije između sestrinskih hromatida u replikativnoj viljušci. Moguće je da je ponovak neophodan kao preduslov za formiranje neke rekombinogene strukture koja će omogućiti kontakt i rekombinaciju. S obzirom na to da IS5 kao učesnik rekombinacije ima već pomenutu specifičnu strukturu, može se pretpostaviti da on čini deo rekombinogenog kompleksa. U *polA1* i *dam* mutantima u kojima je prisustvo jednolančanih prekida povećano i produženo, šansa za interakciju rekombinogenih kompleksa je povećana. S druge strane, teorijski je moguće da dve IS5 dođu u kontakt i formiranjem petlje (“B Loop-out”).

Da li je deo sekvence IS5 elementa koji učestvuje u “site specific” rekombinaciji dovoljan za ostvarivanje kontakta ili je za to potrebna duža homologija koju nosi IS5? Ovo ostaje otvoreno pitanje vezano za rekombinaciju IS elemenata. Možda je njihova uloga kao mobilnih elemenata prevashodno vezana za transpoziciju koja zahteva intaktan IS, dok je uloga IS elemenata kao pokretnih nosioca homologije sekundarna, pri čemu u rekombinaciji učestvuju samo određeni segmenti IS elemenata, ne zahtevajući intaktan element.

Zaokružujući sa velikim delecijama našu originalnu studiju o *polA1* mutantima i njihovom mutatorskom efektu praćenom na histidinskom operonu hromozoma *E.coli* kroz analizu mutacionih događaja na nivou nukleotidne sekvence, pokazali smo da *polA1* alel kreira isključivo delecije. Male delecije (*hisA*, *hisD*, *hisC*) nastaju “proklizavanjem” između repetitivnih sekvenci prema modelu Streisinger-a, dok velike delecije (*his-gnd*) nastaju rekombinacijom između IS5 elemenata kao repetitivnih sekvenci koje omeđuju *his* operon, po tipu “site specific” rekombinacije. Prema ovoj studiji, *polA1* kao mutatorski soj koji akumulira jednolančane prekide i praznine na DNK lancu, promoviše delecije favorizujući “slippage” i “site specific” rekombinaciju.

ZAKLJUČCI

NATÚRA ETIAM IN MÍNIMUS MÁXIMA.

Priroda je i u najmanjim svarima veoma velika.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Velike delecije (*his-gnd*) nastaju rekombinacijom između dva IS5 elementa koji omeđuju histidinski operon hromozoma *E.coli*.
2. Ovaj rekombinacioni događaj se i pored ekstenzivne homologije odigrava *recA* nezavisnim mehanizmom.
3. Analiza na nivou primarne strukture DNK pokazuje da rekombinacija uvek prolazi u okviru regiona od 290 bp na levom terminusu IS5, što ukazuje da se rekombinacija odvija po tipu "site specific".
4. Frekvencija nastajanja velikih delecija je povećana u *polA1* i *dam* sojevima koji akumuliraju jednolančane prekide. U *polA1* soju rekombinacija je dva puta povećana u odnosu na divlji soj.
5. *PolA1* alel ne pokazuje nikakvu specifičnost u kreiranju ovih delecija, jer nukleotidna sekvenca pokazuje da se proces rekombinacije odigrava na isti način u *polA1* i u divljem soju.
6. Velika je verovatnoća da IHF protein doprinosi promovisanju velikih delecija, s obzirom na to da se rekombinacija odvija po tipu "site specific" i da DNK segment koji učestvuje u rekombinaciji ima mesto za vezivanje ovog proteina.

LITERATURA

QUAÉRITE ET INVENIÉTIS.

Tražite - i naći ćete.

NULLA TERRA EXÍLIUM EST, SED ÁLTERA PATRIA. (*Seneca*)

Nijedna zemlja nije zemlja izgnanstva, već druga otadžbina.

7. L I T E R A T U R A

Albertini, A.M., Hoffer, M., Calos, M.P., Miller, J.H., (1982). On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell*, **29**, 319-328.

Altschul Stephen, F., Warren Gish, Webb Miller, Eugen W.M., and David J. Lipman, (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, **215**, 403-410.

Altschul Stephen,F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucl.AcidsRes.*, **25**, 3389-3402.

Bachellier, S., Gilson, E., Hofnung, M., and Hill, C.W., (1996). Repeated Sequences. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C. et al. (eds), Vol **2**, pp. 2012-2040. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Bachman B., (1983). Linkage map of *E.coli* K-12 , Edition 7, *Microbiol.Rew.*, **47**, 180-230.

Barchnecht, T.R. and Smith, K.C., (1978). The involvement of DNA polymerase I in the postreplication repair of ultraviolet radiation-induced damage in *Escherichia coli* K-12. *Mol.Gen.Genet.*, **167**, 37-41.

Berg C.M., (1971). Auxotroph accumulation in deoxyribonucleic acid polymeraseless strains of *Escherichia coli* K12. *J.Bacteriol.*, **106**, 797-801.

Berlyn, M.K., Brooks Low, K., and Rudd, K.E. (1996). Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 9. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, F.C. et al.(eds), Vol 2, pp.1715-1702. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Better, M., Lu,C., Williams, R.C., and Echols, H., (1982). Site-Specific DNA condensation and pairing mediated by the Int protein of bacteriophage lambda . *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **79**, 5837-5841.

Birkenbihl, R.P., and Vielmetter, W., (1989). Complete maps of IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS30 and IS150 locations in *Escherichia coli* K-12. *Mol.Gen.Genet.*, **220**, 147-153.

Blattner, F.R., Fiandt, M., Hass, K.K., Twose, P.A., and Szybalski, W. (1974). Deletions and insertionas of colliphage lambda: revised measurement of the promoter-startpoint distance. *Virology*, **62**, 458-471.

Blattner, R.F., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland,V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode,C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Wayne Davis, N., Kirkpatrick, H.A., Goeden,

- M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao Y., (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1462.
- Boccard, F., and Prentki, P., (1993). Specific interaction of IHF with RIBs, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units. *EMBO J.*, **12**, 5019-5027.
- Braedt, G., (1985). Recombination in *recA* cells between direct repeats of insertion element IS1. *J.Bacteriol.*, **162**, 529-534.
- Brayan, S., Chen, H., Sun, Y. and Moses, R.E., (1988). Alternate pathways of DNA replication in *Escherichia coli*. *Bioche.Biophys.Acta*, **951**, 249-254.
- Brayan, S.K. and Moses, R.E., (1984). Map location of the *pcbA* mutation and physiology of the mutant. *J.Bacteriol.*, **158**, 216-221.
- Brayan, S.K., and Moses R.E., (1988). Sufficiency of the Klenow fragment for survival of *polC* (Ts) *pcbA1 Escherichia coli* at 43°C. *J.Bacteriol.*, **170**, 456-458.
- Brown, W.E., Stump, K.H. and Kelly W.S., (1982). *Escherichia coli* DNA polymerase I. Sequence characteristic and secondary structure prediction. *J.Biol.Chem.*, **257**, 1965-1972.
- Brutalig, D., M.R. Atkinson, P. Setlow, and A. Kornberg, (1969). An active fragment of DNA polymerase produced by proteolytic cleavage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **37**, 982-989.
- Carlomagno, M.S., Chiarotti, L., Alifano, P., Nappo, A.G., Bruni, C.B., (1988). Structure and function of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. *J.Mol.Biol.*, **203**, 585-606.
- Caron, P.R., Kuchner, S.R. and Grossman, L., (1985). Involvement of helicase II (*uvrD* gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the *uvrABC* protein complex. *PNAS*, **82**, 4925-4929.
- Chedin F., E. Dervyn, R. Dervyn, S.D. Ehrlich and P. Noirot, (1994). Frequency of deletion formation decreases exponentially with distance between short direct repeats. *Mol.Microbiology*, **12**, 561-569.
- Chow, L.T., (1977). Sequence arrangements of the *Escherichia coli* Chromosome and of Putative Insertion Sequences, as Revealed by Electron Microscopic heteroduplex Studies. *J.Mol.Biol.*, **113**, 611-621.
- Chow, L.T., and Broker, T.R., (1978). Adjacent insertion sequence IS2 and IS5 in bacteriophage Mu mutants and an IS5 in a lambda *darg* bacteriophage. *J.Bacteriol.*, **133**, 1427-1436.
- Conley, E.C., Saunders, V.A., Saunders, J.R., (1986). Deletion and rearrangement of plasmid DNA during transformation of *Escherichia coli* with linear plasmid molecules. *Nucl.AcidsRes.*, **14**, 8905-8917.
- Cooper, P.K. and Hanawalt, P.A., (1972.a). Role of DNA polymerase I and the *rec* system in excision repair in *Escherichia coli*. *PNAS*, **69**, 1156-1160.
- Cooper, P.K., and P.C. Hanawalt, (1972.b). Heterogeneity of patch size of repair replicated DNA in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.*, **67**, 1-10.
- Cooper P.K., (1982). Characterization of long-patch excision repair of DNA in UV-irradiated *Escherichia coli*: An inducible function under Rec-Lex control. *Mol.Gen.Genet.*, **185**, 189-197.

- Cox, M.M. and Lehman, I.R., (1987). Enzymes of general recombination. *Ann.Rev.Biochem.*, **56**, 226-262.
- Coukell MB., and Yanofsky C., (1970). Increased frequency of deletions in DNA polymerase mutants of *Escherichia coli*. *Nature*, **228**, 633-636.
- Craig, N.L., and Kleckner, N., (1987). Transposition and Site-Specific Recombination. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. F.C.Neidhardt et al. (eds), Vol 2, pp. 1054-1070.
- Craig, N.L., and Nash, H.A., (1984). E.coli Integration Host Factor binds to specific sites in DNA. *Cell*, **39**, 707-716.
- Datta, N., and Hughes, V.M., (1983). Plasmids of the same Inc groups in enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*, **306**, 616-617.
- Davis, R.W., Bostein, D., and Roth, J.B., (1980). A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics, Cold Spring Harbor, New York.
- De Lucia, P., and Cairns, J., (1969). Isolation of an *E.coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature*, **224**, 1164-1166.
- Deonier, R.C., (1996). Native Insertion Sequence Elements: Locations, Distributions, and Sequence Relationships. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C. et al.(eds), Vol 2, pp. 2000-2011. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Derbichire, V., Freemont, P.S., Sanderson, M.R., Beese, L., Friedman, J., Joyce, C.M. and Steitz, T.A., (1988). Genetic and crystallographic studies of 3'-5' exonuclease site of DNA polymerase I. *Science*, **240**, 199-201.
- Dianov, G.L., Kuzminov, A.V., Mazin, A.V., and Salganik, R.I., (1991). Molecular mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. I. Deletion formation mediated by long direct repeats. *Mol.Gen.Genet.*, **228**, 153-159.
- Dlakić, M., and Harrington, E., (1998). DIAMOND: display and modeling of DNA bending. *Bioinformatics*, **14**, 1-6.
- Drake, J.W., (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 7160-7164.
- Dubelman, S., and R. Shapiro, (1977). A method for isolation of cross-linked nucleosides from DNA: application to cross-links induced by nitrous acid. *Nucl.Acids Res.*, **4**, 1815-1827.
- Echols, H., and M.F.Goodman., (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev.Biochem.*, **60**, 477-511.
- Egelman, E.H., and X.Yu, (1989). The location of DNA in RecA-DNA Helical Filaments. *Science*, **245**, 404-406.
- Ehrlich, S.D., (1989). Illegitimate recombination in bacteria. In: *Mobile DNA*, Berg, D.E., and Howe, M.M., pp. 799-832. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Engelhorn, M., Boccard, F., Murtin, C., Prentki, P., and Geiselman, J., (1995). *In vivo* interaction of the *Escherichia coli* integration host factor with its specific binding sites. *Nucl.AcidsRes.*, **23**, 2959-2965.

Engler, J.A., and Van Bree, M.P., (1981). The nucleotide sequence and protein-coding capability of the transposable element IS5. *Gene*, **14**, 155-163.

Ennis, D.G., Amundsen, S.K., and Smith, G.R., (1987). Genetic functions promoting homologous recombination in *Escherichia coli*: a study of inversion in phage lambda. *Genetics*, **115**, 11-24.

Finkel, S.E., and Johnson, R.C., (1992). The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol.Microbiol.*, **6**, 3257-3265.

Fishel, R.A., James, A.A., and Kolander, R., (1981). *recA*-independent general genetic recombination of plasmids. *Nature*, **294**, 184-186.

Fix D.F., Burns, P.A., and Glickman B.W., (1987). DNA sequence analysis of spontaneous mutation in PolA1 strain of *Escherichia coli* indicates sequence-specific effects. *Mol.Gen.Genet.*, **207**, 267-272.

Freemont, P.S., Ollis, D.L., Steitz, T.A. and Joyce, C.M., (1986). A domain of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **1**, 66-73.

Friedman, D.I., (1988). Integration Host Factor: A Protein for All Reasons. *Cell*, **55**, 545-554.

Fuller, R.S., Funnell, B.E., and Kornberg, A., (1984). The DnaA protein complex with the *E.coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell*, **38**, 889-900.

Galas, D.J., and Chandler, M., (1989). Bacterial Insertion Sequences. In: *Mobile DNA*, Berg, D.E. and Howe, M.M., pp. 109-161. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Gamas, P., Chandler, M.G., Prentki, P., and Galas, D.J., (1987). *Escherichia coli* integration host factor binds specifically to the ends of the insertion sequence IS1 and to its major insertion hot-spot in pBR322. *J.Mol.Biol.*, **195**, 261-272.

Geigl, E.-M., and F.Eckardt-Schupp, (1991). The repair of double-strand breaks and S1 nuclease-sensitive sites can be monitored chromosome-specifically in *Saccharomyces cerevisiae* using pulsed-field gel electrophoresis. *Mol.Microbiology*, **5**, 1615-1620.

Gilad, H., Koby, S., Prag, G., Engelhorn, M., Geiselman, J., and Oppenheim, A.B., (1998). Participation of IHF and a distant UP element in the stimulation of the phage λ P_L promoter. *Mol.Microbiology*, **30**, 443-451.

Gilson, E., D.Perrin, and M.Hofnung, (1990). DNA polymerase I and protein complex bind specifically to *E.coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. *Nucl.Acids.Res.*, **18**, 3941-3952.

Gille, H., Egan, J.B., Roth, A., and Messer, W., (1991). The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucl.AcidsRes.*, **19**, 4167-4172.

Glickman B.W., Burns PA, and Fix DF., (1986). Mechanisms of spontaneous mutagenesis: Clues from altered mutational specificity in DNA repair-defective strains. In: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis: Mechanisms*. Shankel DM, Hartman PE, Kada T, Hollaender A (eds) Plenum Press, New York and London, pp. 259-281.

- Glickman, B.W., and L.S. Riplay., (1984). Structural intermediates of deletion mutagenesis: a role for palindromic DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **81**,512-516.
- Glickman, B.W., and Rutgers, T., (1979). The influence of *polA1* mutation upon recombination in *Escherichia coli* K-12. *Can.J.Genet.Cytol.*, **21**, 423-428.
- Goldberg, I., and Mekalonos, J.J., (1986). Effect of *recA* mutation on cholera toxin gene amplification and deletion events. *J.Bacteriol.*, **165**, 723-731.
- Green, L., Miller, R.D., Dykhuizen, D.E. and Hartl, D.L., (1984). Distribution of insertion element IS5 in natural isolates of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Aacad.Sci. USA*, **81**, 4500-4504.
- Grossman , L., (1981) Enzymes involved in the repair of damaged DNA . *Arch.Biochem.Biophys.*, **211**, 511-522.
- Haffer, P., Bickle, A., (1987). Purification and DNA-binding properties of Fis and Cin, two proteins required for the bacteriophage P1 site specific recombination system, *cin*. *J.Mol.Biol.*, **198**, 579-587.
- Hales, L.M., Gumport, R.I., and Gardner, J.F., (1994). Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites. *J.Bacteriol.*,**176**, 2999-3006.
- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K., and Smith, S.A., (1979). DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann.Rev.Biochem.*, **48**, 783-836.
- Hatchinson F., (1996). Mutagenesis. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology , Neidhardt FC. et al. (eds), Vol 2, pp. 2218-2234.
- Hays, J.B., Korba, B.E., and Konrad, E.B., (1980). Novel mutations of *Escherichia coli* that produce recombinogenic lesions in DNA. I. Identification an mapping of *arl* mutations. *J.Mol.Biol.*, **139**, 455.
- Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, J.D., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrepf, H., (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. Norwich, U.K., The John Innes Foundation.
- Howard-Flanders, P., S.C.West, and A.Stasiak, (1984). Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature*, **309**, 215-219.
- Hubner,P., and Arber, W., (1989). Mutational analysis of procaryotic recombinational enhancer element with two functions. *EMBO*, **8**, 577-585.
- Hughes, V.M., and Datta, N., (1983). Conjugal plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature*, **302**, 725-726.
- Ishiguro, N., and Sato, G., (1984). Spontaneous deletion of Citrate-utilizing ability promoted by Insertion Sequences. *J.Bacteriol.*, **160**, 642-650.
- Janković, M., Kostić,T., and Savić, D.J., (1990). DNA sequence analysis of spontaneous histidine mutations in a *polA1* strain of *Escherichia coli* k12 suggests a specific role of the GTGG sequence. *Mol.Gen.Genet.*, **223**, 481-486.
- Janković Mila, Magistarska teza (1990).

- Johnson, R.C., (1978). Reduction in postreplication DNA repair in two *Escherichia coli* mutants with temperature-sensitive polymerase III activity: implication for the postreplication repair pathway. *J.Bacteriol.*, **158**, 636-634.
- Johnson, R.C., and M.I.Simon,(1987). Enhancers of site-specific recombination in bacteria. *Trends in Genetics*, **3**, 262-267.
- Johnson, R.C., Ball, D., Pfeffer, and Simon,M., (1988). Isolation of the gene encoding the Hin recombinational enhancer binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **85**, 3484-3488.
- Joyce, C.M., and Grindley, N.D.F., (1983). Construction of plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *PNAS*, **8**, 1830-1834.
- Joyce C.M. and Steitz, T.A., (1987). DNA polymerase I: From crystal structure to function via genetics. *Trends Biochem.Sci.*, **12**, 288-292.
- Joyce C.M., Fuji,D.M., Lacks,H.S., Hughes,C.M. and Grindley,N.C.F., (1985). Genetic mapping and DNA sequence analysis of mutations in the *polA* gene of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.*, **186**, 283-293.
- Joyce, C.M., Kelly,W.S., and Grindley,N.D.F., (1982). Nucleotide sequence of *Escherichia coli polA* gene and primary structure of DNA polymerase I. *J.Biol.Chem.*, **25**, 1958-1964.
- Joyce C.M., N.D.F.Grindley, (1984). Method for determining whether a gene of *Escherichia coli* is essential: Application to the *polA* gene. *J.Bacteriol.*, **158**, 636-643.
- Kelley, W.S., K.Chalmers, N.E.Murray, (1977). Isolation and characterization of lambda *polA* transducing phage. *PNAS*, **7**, 5632-5636.
- Kelley, W.S., and Joyce, C.M., (1983). Genetic characterisation of early amber mutations in the *E.coli polA* gene and purification of the amber peptides. *J.Mol.Biol.*, **164**, 529-560.
- Klenow, H., and I.Henningsen, (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *E.coli B* by a limited proteolysis. *PNAS*, **74**, 5632-5636.
- Kohara, Y., Akiyama, K., Isono, K., (1987). The physical map of the whole *E.coli* chromosome: application of new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell*, **50**, 495-508.
- Konrad, E.B., (1977). Method for the isolation of *Escherichia coli* mutants with enhanced recombination between chromosomal duplications. *J.Bacteriol.*, **130**, 167-172.
- Koo H-S, Wu H-M, Crothers DM, (1986). DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature*, **320**, 501-506.
- Korba, B.E., and Hays, J.B., (1980). Novel mutations of *Escherichia coli* that produce recombinogenic lesions in DNA. II properties of recombinogenic λ phages grown on bacteria carrying *arl* mutations. *J.Mol.Biol.*, **139**, 473.
- Kornberg, A. (1980). *DNA replication*, W.E.Freeman and Co., San Francisco.
- Kornberg, A. (1982). *Supplement to DNA Replication*, W.E.Freeman and Co., San Francisco.

- Kostić Tatjana, Magistarska teza (1990).
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., and Rehrauer, W.M., (1994). Biochemistry of Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **58**, 401-465.
- Kroger, M., and Hobom, G., (1982). Structural analysis of insertion sequence IS5. *Nature*, **297**, 159-162.
- Lackey, D., Krauss, S.W. and Linn, S., (1982). Isolation of an altered form of DNA polymerase I from *Escherichia coli* cells induced for *recA/lexA* functions. *PNAS*, **79**, 330-334.
- Lackey, D., Krauss, S.W. and Linn, S., (1985). Characterisation of DNA polymerase I#, a form of DNA polymerase I found in *Escherichia coli* expressing SOS functions. *J. Biol. Chem.*, **26**, 3178-3184.
- Langer, U., Richter, S., Roth, A., Weigel, C., and Messer, W., (1996). A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiology*, **21**, 301-311.
- Lehninger, A.L., (1975). *Biochemistry*, Worth Publishers.
- Lilley, D., (1986). Bent molecules – how and why? *Nature*, **320**, 487.
- Lloyd, R.G. and K. Brooks Low, (1996). Homologous recombination. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhardt et al. (eds), Vol **2**, pp. 2236-2276. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lobner-Olesen, A., Boye, E., and Marinus, M.G., (1992). Expression of the *Escherichia coli* *dam* gene. *Mol. Microbiology*, **6**, 1841-1851.
- Lovett, S.T., Drapkin, P.T., Sutera Jr, V.A., and Gluckman-Peskind, T.J., (1993). A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics*, **135**, 631-642.
- Lovett, S.T., Gluckman-Peskind, T.J., Simon, J., Sutera Jr, V.A., and Drapkin, P.T., (1994). Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a *recA*-independent, proximity-sensitive mechanism. *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 294-300.
- Mandel, M., and Higa, A., (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 154-158.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., (1982). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marinus, M.G. and Konrad, E.B., (1976). Hyper-recombination in *dam* mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, **149**, 273-277.
- Martinez Leal Juan Fernando, Doktorska teza (1996), Univerzitet u Kordobi, Španija.
- Mazin, A.V., Kuzminov, A.V., Dianov, G.L., and Salganic, R.I., (1991). Molecular mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. II deletion formation mediated by short direct repeats. *Mol. Gen. Genet.*, **228**, 209-214.
- Minkley, Jr. E.G., Leney, A.T., Bodner, J.B., Panicker, M.M. and Brown, W.E., (1984). *Escherichia coli* DNA polymerase I. Construction of a *polA* plasmid for amplification and an improved purification scheme. *J. Biol. Chem.*, **25**, 10386-10392.

- Mizuno, T., (1987). Random cloning of DNA segments from *Escherichia coli* chromosome and primary characterization of their structure. *Nucl.Acids Res.*, **15**, 6827-6841.
- Modrich, P.(1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu.Rev.Genet.*, **25**, 229-253.
- Morisato, D., and Klekner, N., (1987). Tn10 transposition and circle formation in vitro. *Cell*, **51**, 101-111.
- Moses, R.E., Summers, WC (eds), (1988). DNA replication and mutagenesis. American society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H., (1986). Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, **51**, 263-273.
- Muramatsu, S., Kato, M., Kohara, Y, and Mizuno, T., (1988). Insertion sequence IS5 contains a sharply curved DNA structure at its terminus. *Mol.Gen.Genet.*, **214**, 433-438.
- M13 Cloning and Sequenced Systems, Biolabs, A Laboratory Manual.
- Nash, H.A. (1996). Site-Specific Recombination: Integration, Excision, Resolution, and Inversion of Defined DNA Segments. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. F.C.Neidghardt et al.(eds), Vol. **2**, pp. 2363-2375. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nash,H.A., (1996). The HU and IHF proteins: accessory factors for complex protein-DNA assemblies. In: regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. Lin E.C.C.,and Lynch Simon A.(eds). Austin:R.G.Landes Company, pp.149-179.
- Naas, T., Blot,M., Fitch, W.M., and Arber,W., (1994). Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, **136**, 721-730.
- Nevers, P., and Saedler, H., (1977). Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature*, **268**, 109-115.
- Nyman, K., Nakamura, K., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E., (1981). Distribution of the insertion sequence IS1 in Gram-negative bacteria. *Nature*, **289**, 609-612.
- Ogawa,T. and Okazaki, T., (1980). Discontinuous DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 421-457.
- Ogawa, T. and Okazaki T., (1984). Function of Rnase H in DNA replication revealed by Rnase defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol.Gen.Genet.*, **193**, 231-237.
- Okazaki, R., Arisawa, M. and Sugino, A., (1971). Slow joining of newly replicated DNA chains in DNA polymerase I – deficient *Escherichia coli* mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **68**, 2954-2957.
- Oppenheim, A.B., Rudd, K.E., Mendelson, I., and Teff, D., (1993). Integration host factor binds to a unique class of complex repetitive extragenic DNA sequences in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiology*, **10**, 113-122.
- Phadnis, S.H., and Berg, D.E., (1985). *recA*- independent recombination between repeated IS50 elements is not caused by an IS50-encoded function. *J.Bacteriol.*, **161**, 928-932.

- Pierce, J.C., and Masker, W., (1989). Genetic deletion between directly repeated sequences in bacteriophage T7. *Mol.Gen.Genet.*, **217**, 215-222.
- Polayes, D.A., Rice, P.W. and Dahlberg, J.E., (1988). DNA polymerase I activity in *Escherichia coli* is influenced by spot 42 RNA. *J.Bacteriol.*, **170**, 2083-2088.
- Polaczek, P., Kwain, K., Liberles, D.A., and Campbell, J.L., (1997). Role of architectural elements in combinatorial regulation of initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiology*, **26**, 261-275.
- Prentki, P., Chandler, M., and Galas, D., (1987). *Escherichia coli* integration host factor bends the DNA at ends of IS1 and an insertion hotspot with multiple IHF binding sites. *EMBO J.*, **6**, 2479-2487.
- Rac, B., Lusky, M., and Hable, M., (1982). Expression of two proteins from overlapping and oppositely oriented genes on transposable DNA insertion element IS5. *Nature*, **297**, 124-128.
- Rac, B., and M.von Reutern, (1984). Insertion element IS5 contains a third gene. *EMBO J.*, **3**, 807-811.
- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K., and Nash, H.A., (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, **87**, 1295-1306.
- Ripley, L.S., (1990). Frameshift mutation. Determinants of specificity. *Annu.Rev.Genet.*, **24**, 189-213.
- Roth, J.R. et al., (1996). Rearrangements of Bacterial Chromosome: Formation and Applications . In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology , F.C.Neidhardt et al. (eds), Vol **2**, pp.2256-2276.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F.S., Nicklen, S., and Coulson, A.R., (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **74**, 5436-5467.
- Sancar, A., and Rupp, W.D., (1983). A novel repair enzyme: UvrABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, **33**, 249-260.
- Savić, D.J., and Romac S., (1982). Powerful mutator activity of the *polA1* mutation within the hitidine region of *Escherichia coli* K12. *J.Bacteriol.*, **149**, 955-960.
- Savić, D.J., Ristić A., Petrović M., and Kostić T., (1988). On the sequence specificity of mutators deficient in polymerase function of *Escherichia coli* K12 DNA polymerase I: A theoretical prediction. *Bull.Acad.Serbe Sci. Arts Classe Sci. Nat.*, **30**, 5-9.
- Savić, D.J., Janković, M., and Kostić, T., (1990). Cellular role of DNA polymerase I. *J.Basic Microbiol.*, **30**, 769-784.

- Sedwick, S.G. and Bridges, B.A., (1974). Requirement for either DNA polymerase I or DNA polymerase III in postreplication repair in excision-deficient *Escherichia coli*. *Nature*, **249**, 348-349.
- Seingrimsdottir, H., Beare, D., Cole, J., Leal, J.F.M., Kostic, T., Lopez-Barea, J., Dorado, G., and Lehmann, A.R., (1996). Development of new molecular procedures for the detection of genetic alteration in man. *Mutation Res.*, **353**, 109-121.
- Shaaper R., (1993). Base selection, proofreading and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.*, **268**, 23762-23765.
- Sharma, R.C. and K.C. Smith, (1987). Role of DNA polymerase I in postreplication repair: a reexamination with *Escherichia coli* *dpolA*. *J.Bacteriol.*, **169**, 4559-4564.
- Siegel, E.C., and K.K. Vaccaro, (1978). The reversion of *trp* frameshift mutations in *mut*, *polA*, *lig*, and *dnaE* mutant strains of *E.coli*. *Mut.Res.*, **5**, 9-17.
- Siegel E.C. and Vaccaro K.K., (1979). The reversion of *trp* frameshift mutations in *mut*, *polA*, *lig*, and *dnaE* mutant strains of *Escherichia coli*. *Mutat.Res.*, **50**, 9-17.
- Singer, B.S., and Westlye, J., (1988). Deletion formation in bacteriophage T4. *J.Mol.Biol.*, **202**, 233-243.
- Smith, G.R., (1983). *General Recombination in Lambda II*, Cold Spring Harbor Laboratory .
- Smith, G.R., (1987). Mechanism and control of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Ann.Rev.Genet.*, **21**, 179-201.
- Smith, G.R., (1988). Homologous Recombination in Prokaryotes. *Microbiol.Rev.*, **52**, 1-28.
- Snyde, M., Buchman, A.R., and Davis, R.W., (1986). Bent DNA at a yeast autonomously replicating sequence. *Nature*, **324**, 87-89.
- Starlinger, P., (1977). DNA rearrangements in prokaryotes. *Ann.Rev.Genet.*, **11**, 103-126.
- Streisinger G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E., Inouye, M. (1966). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, **31**, 77-84.
- Stenzel, T.T., Petal, P., and Bastia, D., (1987). The Integration Host Factor of *Escherichia coli* Binds to Bent DNA at the Origin of Replication of the Plasmid pSC101. *Cell*, **49**, 709-717.
- Schmid, B.M., (1990). More than just "histon like" proteins. *Cell*, **63**, 451-453.
- Schoner, B., and Kahn, M., (1981). The nucleotide sequence of IS5 from *Escherichia coli*. *Gene*, **14**, 165-174.
- Schoner, B., and Schoner, R., (1981). Distribution of IS5 in bacteria. *Gene*, **16**, 347-352.
- Southern, E.M., (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*, **98**, 503-517.
- Tait, R.C., Harris, A.L. and Smith, D.W., (1974). DNA repair in *Escherichia coli* mutants deficient in DNA polymerase I, II and/or III. *PNAS*, **71**, 675-679.

- Timmons, M.S., and Deonier, R.C., (1986). Recombination between IS5 elements: requirement for homology and recombination functions. *Genetics*, **113**, 797-810.
- Thompson, J.F., and Landy, A. (1989). Regulation of Bacteriophage Lambda Site-Specific Recombination. In: *Mobile DNA*, Berg, D.E. and Howe, M.M. pp. 1-22.
- Thompson, J.F., and Landy, A., (1988). Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucl.Acids Res.*, **16**, 9687-9705.
- Tracy, R.B., and Kowalczykowski, S.C., (1996). In vitro selection of preferred DNA pairing sequences by the *Escherichia coli* RecA protein. *Genes and Dev.*, **10**, 1890-1903.
- Tracy, R.B., Baaumohl, J.K., and Kowalczykowski, S.C. (1997). The preference for GT-rich DNA by the yeast Rad51 protein defines a set of universal pairing sequences. *Genes and Dev.*, **11**, 3423-3431.
- Ulanofsky, L.E., Trifonov, E.N., (1987). Estimation of wedge components in curved DNA. *Nature*, **326**, 720-722.
- Umeda, M., and Ohtsubo, E., (1990). Mapping of Insertion Element IS5 in the *Escherichia coli* K-12 Chromosome. *Chromosomal Rearrangements Mediated by IS5*. *J.Mol.Biol.*, **213**, 229-237.
- Vaccaro, k.K., and E.C.Siegel, (1975). Increased spontaneous reversion of certain frameshift mutations in DNA polymerase deficient strains of *E.coli*. *Mol.Gen.Genet.*, **141**, 251-262.
- Van Houten, B.,(1990). Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microb.Rew.*, **54**, 18-51.
- Walker, G.C.,(1985). Inducible DNA repair systems. *Ann.Rev.Biochem.*, **5**, 425-457.
- Walker, G.C., March, L. and Dodson, L.A., (1985). Genetic analyses of DNA repair: Interference and extrapolation. *Ann.Rev.Genet.*, **19**, 103-126.
- Walker, G.C., (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *Microbiol.Rew.*, **48**, 60-93.
- Ward, D.F., N.E.Murray, (1980). Construction and characterization of *E.coli polA-lacZ* gene fusions. *J.Bacteriol.*, **142**, 962-972.
- Wahl, A.F., Hochensmith, J.W., Kowalsky, S. and Bambara, R., (1983). Alternative explanation for excision repair deficiency caused by the *polAex1* Mutation. *J.Bacteriol.*, **155**, 922-925.
- Watson, D.J., M. Gilman, J.Witkowski, and M.Zoller, (1992). *Recombinant DNA*. Scientific American Books, New York.
- Way, J.C., and Klekner, N., (1984). Essential sites at transposon Tn10 termini. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **81**, 3452-3456.
- Weinstock, G.M., (1987). General recombination in *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Neidhart, F.C. et al. (eds), Vol. **2**, pp.1034-1043. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- West, S.C.. (1994). The Processing of Recombination Intermediates: Mechanistic Insights from Studies of Bacterial Proteins. *Cell*, **76**, 9-15.

Wolf, R.E., (1980). Integration of Specialized Transducing Bacteriophage λ *cI857 St68 h80 dgnd his* by an Unusual Pathway Promotes Formation of Deletions and generates a New Translocatable Element. *J.Bacteriol.*, **142**, 588-602.

Yang, Y. and Ames, G.F.-L. (1988). DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **85**, 8850-8854.

Yang, Y., and Masker, W., (1997). Double-strand breaks increase the incidence of genetic deletion associated with intermolecular recombination in bacteriophage T7. *Mol.Gen.Genet.*, **255**, 277-284.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J., (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp19 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.

Yasuzawa, K., N.Hayashi, N.Goshima, K.Kohno, F.Imamoto, and Y.Kano., (1992). Histon-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. *Gene*, **122**, 9-15.

Yutaka, I., and Kondo, S., (1972). Spontaneous and radiation-induced deletion mutations in *Escherichia coli* strains with different DNA repair capacities. *Mutation.Res.*, **16**, 13-25.

Zeig, J., Maples, V.F. and Kushner, S.R., (1978). Recombination levels of *Escherichia coli* deficient in various replication, recombination, or repair genes. *J.Bacteriol.*, **134**, 958-966.

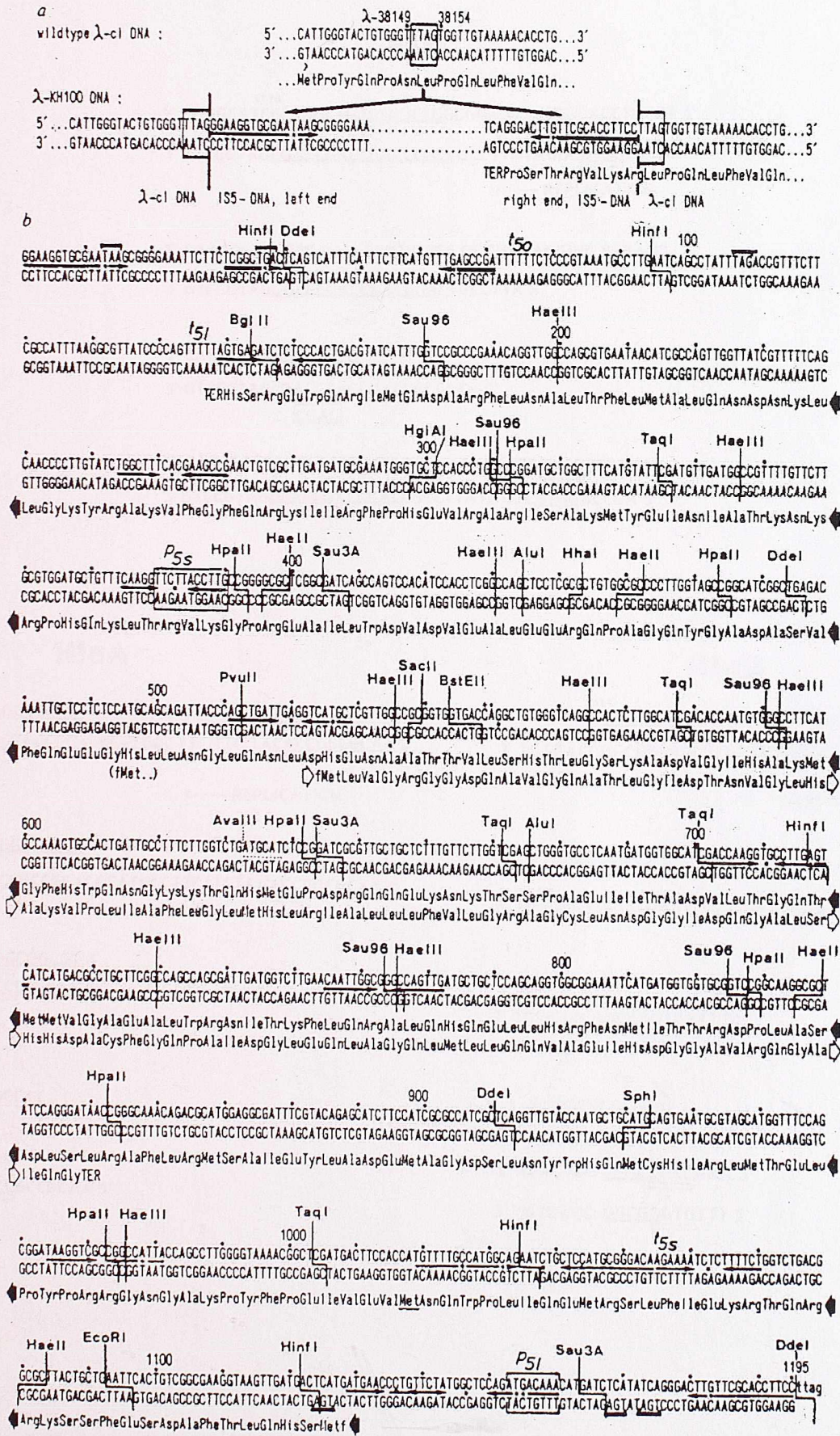
PRILOZI

NIL SINE MAGNO VITA LABÓRE DEDIT MORTÁLIBUS. (*Horacije*)

Život nije dao ljudima ništa bez velikog truda.

8. PRILOZI

PRILOG 1
(Kroger and Hobom, 1982)



HisC

³¹⁷⁴
5' CAGGCATCGCTGGCTGGCTGGCTGGCGGAATATCCGCACCTGGCT 3'
3' GTCCGTAGCGACCGACCGACCGACCGCCTTATAGGCGTGGACCGA 5'
<---- REPLICATION

5' CAGGCATCGCTG-----> SYNTHESSES OF THE LAGGING STRAND
3' GTCCGTAGCGACCGACCGACCGACCGCCTTA 5'

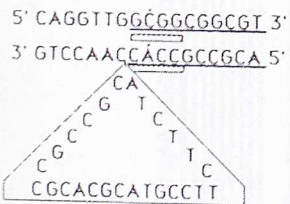
5' CAGGCATCGCTGGCTG----->
3' GTCCGTAGCGACCGACCGACCGCCTTA 5'
CGAC

5' CAGGCATCGCTGGCTGGCTGGCGGAATATCCGCACCTGGCT 3'
3' GTCCGTAGCGACCGACCGACCGCCTTATAGGCGTGGACCGA 5'

HisA

⁵⁵⁵³
5' CAGGTTGGCGGCGGCGTGCGTACGGAAGAAGATGTGGCGGCGTT 3'
3' GTCCAACCGCCGCCGCACGCATGCC TTC TTC TACACCGCCGCAA 5'
<---- REPLICATION

5' CAGGTTGGCGGCGGCGT->SYNTHESSES OF THE LAGGING STRAND
3' GTCCAACCGCCGCCGCACGCATGCCCTTCTTCTACACCGCCGCAA 5'

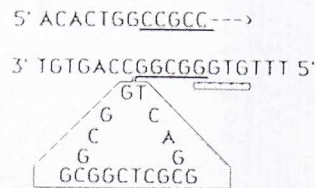


5' CAGGTTG:GTGGCGGCGTT 3'
3' GTGGAAC:CAACCGCCGCAA 5'

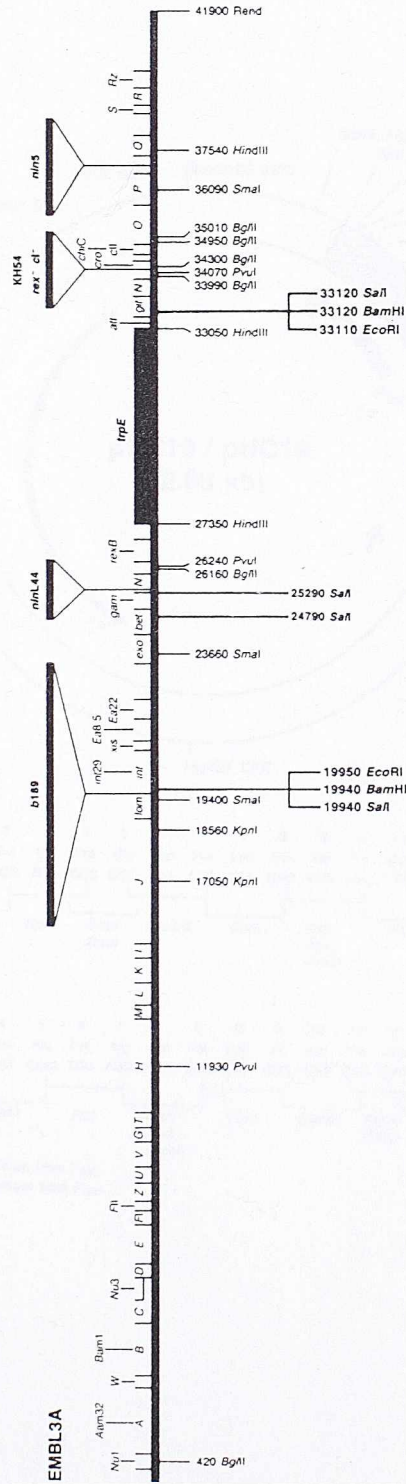
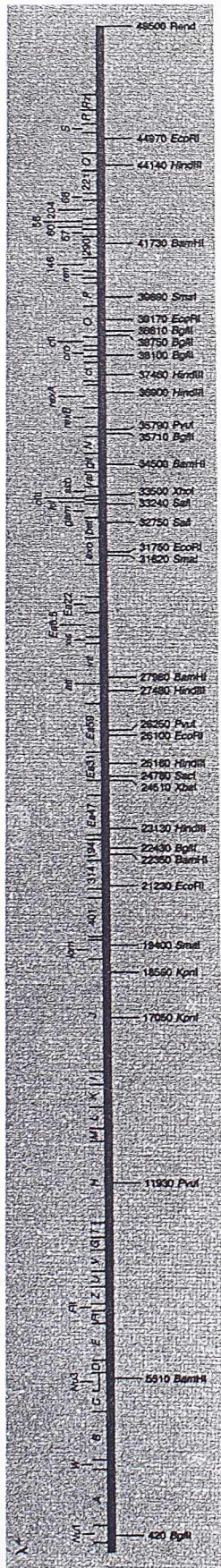
HisD

²⁵¹¹
5' ACACTGGCCGCCGCCGAGCGCCTGACCGCCACAAA 3'
3' TGTGACCGCGCGGCTCGCGGAGTGGCGGTGTTT 5'
<---- REPLICATION

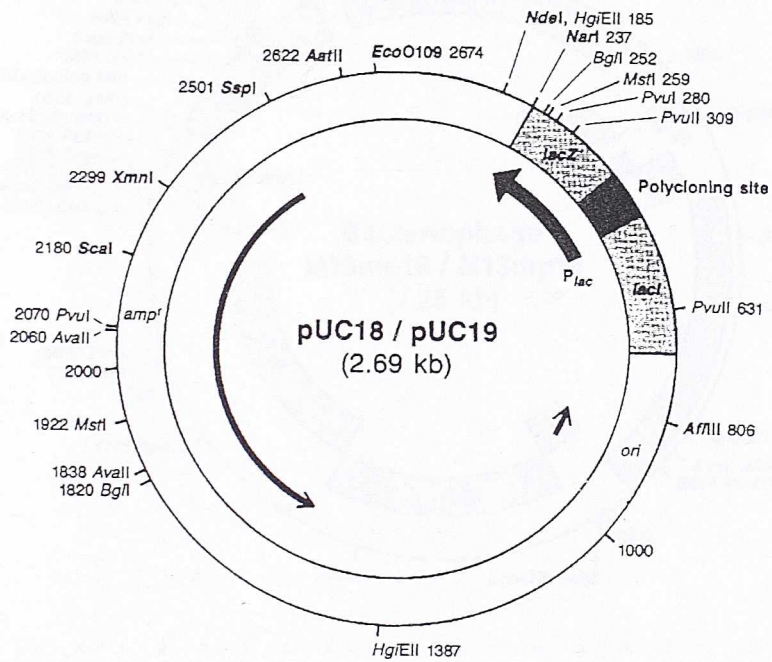
5' ACACTGGCCGCC-----> SYNTHESSES OF THE LAGGING STRAND
3' TGTGACCGCGCGGCTCGCGGACTGGCGGTGTTT 5'



5' ACACTGG:CCGCCACAAA 3'
3' TGTGACC:GGCGGTGTTT 5'



EMBL4:
restriktiona mesta EcoRI, BamHI i SmaI su invertovana



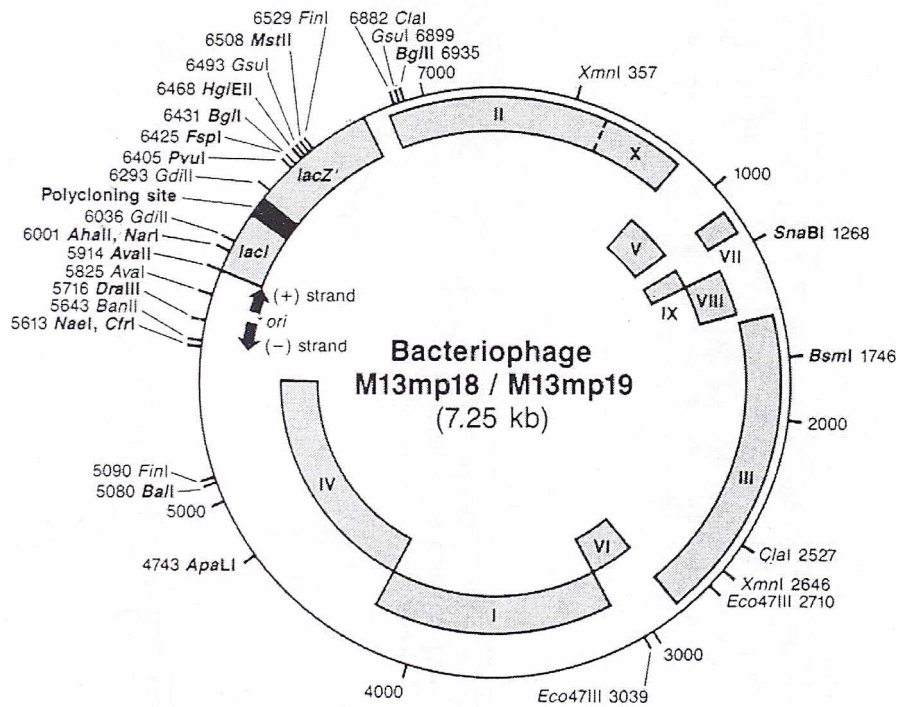
Polycloning Sites
pUC18

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC
				EcoRI		SacI		KpnI		SmaI XmaI		BamHI		XbaI		SaI AccI HincII		PstI		SphI		HindIII				

pUC19

1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC
				HindIII		SphI		PstI		SaI AccI HincII		XbaI		BamHI		SmaI XmaI		KpnI		SacI		EcoRI				

In pUC18, the *EcoRI* site lies immediately downstream from *Plac*.
In pUC19, the *HindIII* site lies immediately downstream from *Plac*.



Polycloning Sites
M13mp18

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC
				EcoRI		SacI		KpnI		SmaI XmaI		BamHI		XbaI		SalI AccI HincII		PstI		SphI		HindIII				

M13mp19

1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8	
Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC
				HindIII		SphI		PstI		SalI AccI HincII		XbaI		BamHI		SmaI XmaI		KpnI		SacI		EcoRI				

In M13mp18, the *EcoRI* site lies immediately downstream from *P_{lac}*.
In M13mp19, the *HindIII* site lies immediately downstream from *P_{lac}*.

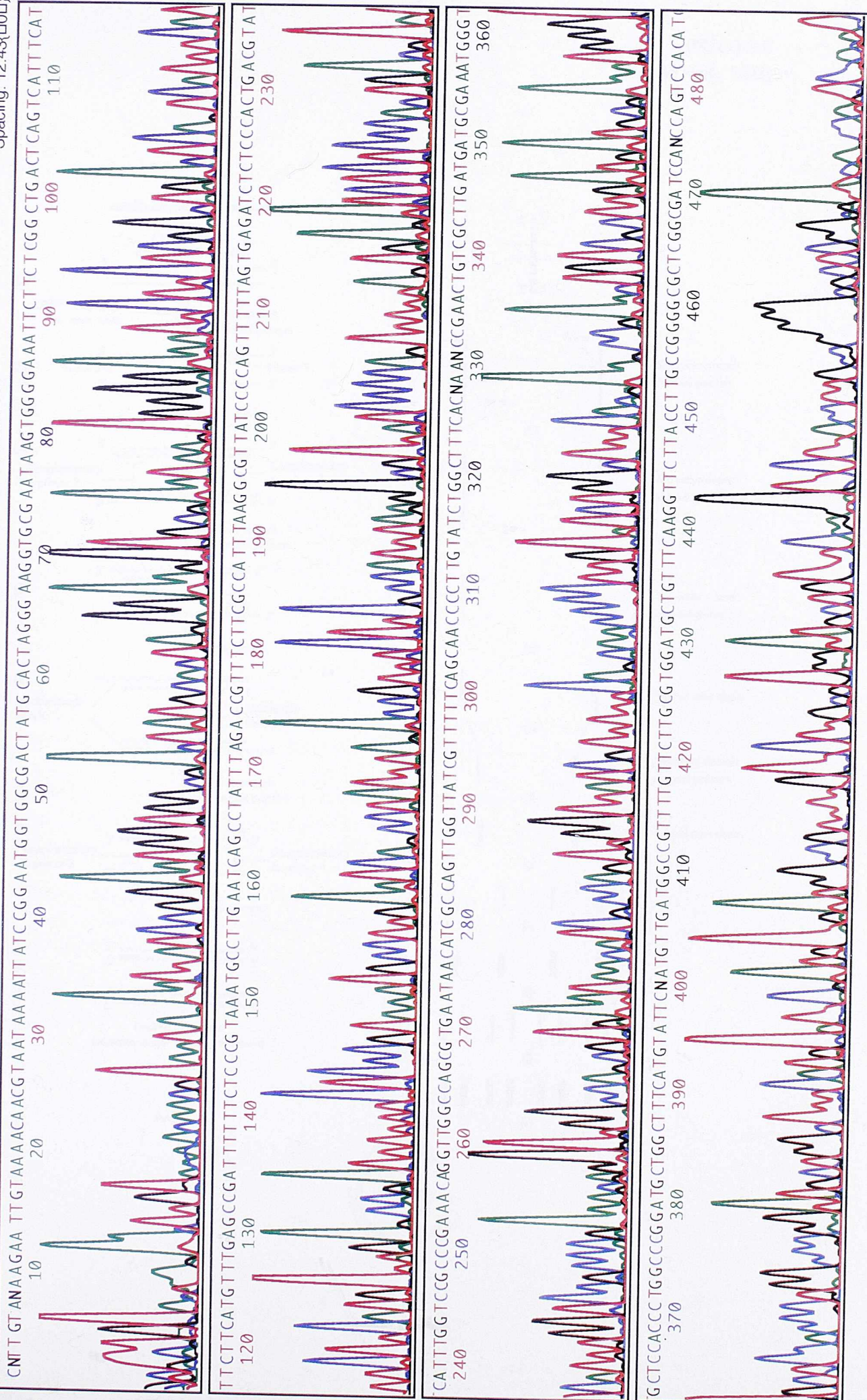


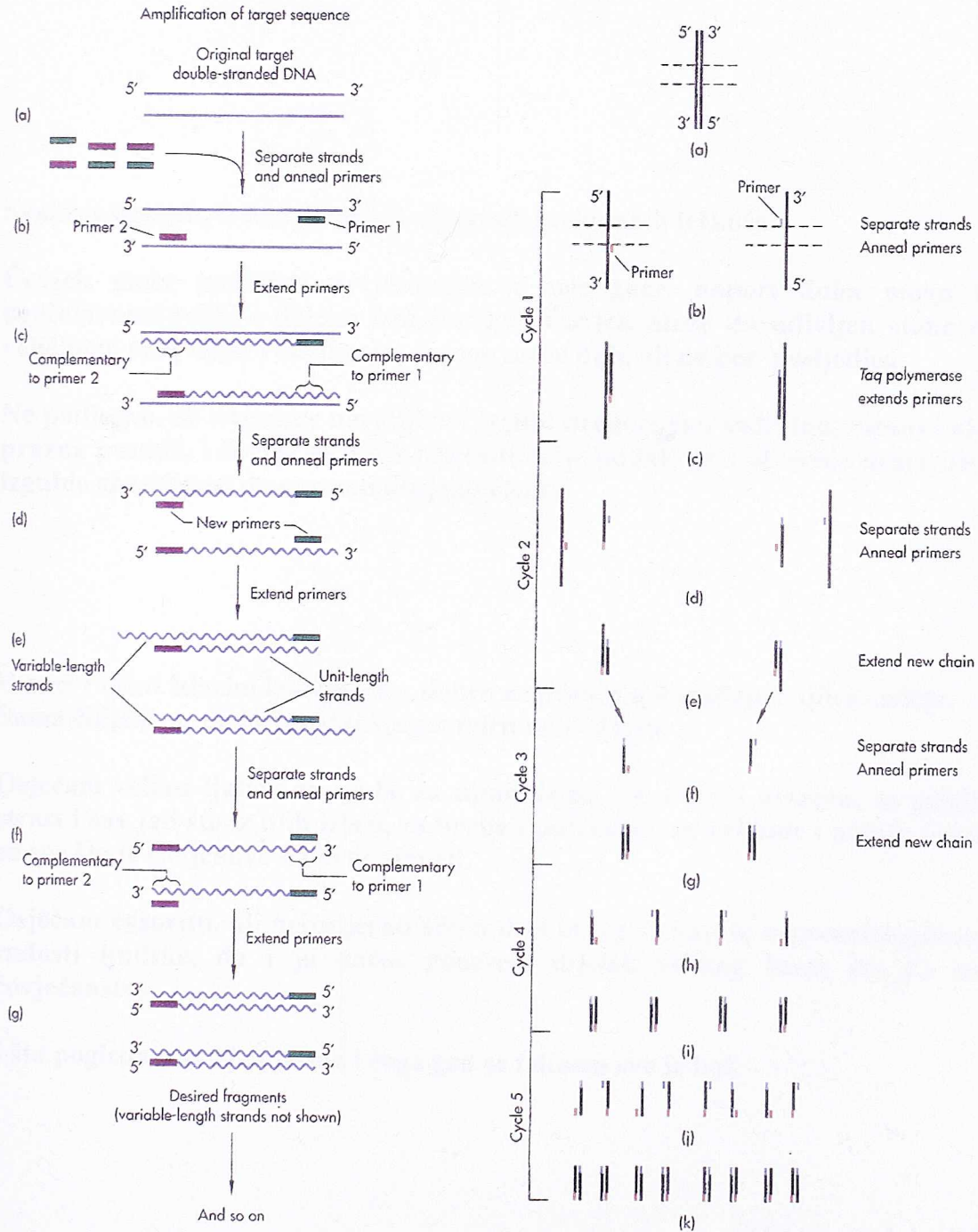
Model
Version 3.4.1
ABI100
Version 2.1.1

Sample 04
delta II 1
Lane 4

Signal G:119 A:140 T:78 C:57
DT4%Ac{A Set-AnyPrimer}
402StretchMatrices
Points 301 to 8626 Pk 1 Loc: 301

Page 1 of 2
juev., 20 abril 2000 19:22
mart., 29 febr 2000 20:05
Spacing: 12.43[00]





Svaki se uspijeh, u stvari, sastoji od samih savladanih teškoća.

Čovjek može podnijeti nevjerovatno i nemoguće, napori duha mogu biti neočekivano veliki i daleko iznad snage. Čovjek može da udivljen stane nad veličinom svog djela i odricanja; mnogo može duh, ali ne bez posljedica.

Ne podlegne, ali napukne nevidljivo i izgubi dragocijenu sadržinu, ostane suha i prazna posuda, i čovjek se može ponositi da je podnio sve, ali sreće nema, jer je izgubio sposobnost da se svom uspjehu raduje.

U noći i tišini izlazim lako iz sebe, dobro zagledam u događaje i njino naličje.
Sama činjenica: da živim, daruje me mirnom radošću.

Osjećam veliku ljubav za ljude, za njina dijela, za sreću i nesreću, za grijeh i strast i sav jad što iz njih izlazi, za borbe i posrtanja, za zablude i patnje i žrtve, za sve što je čovjekovo na ovoj planeti.

Osjećam časovitu, ali neizmjernu sreću da i ja pijem kap iz nepresušnog izvora radosti ljudske, da i ja načas ponesem dijelak velikog krsta što ga nosi čovječanstvo.

I što pogledam sve je pjesma i čega god se taknem sve je bol.

(Ex ponto, I.Andrić)

ZAHVALJUJEM

svim mojim dragim prijateljima i kolegama
iz Kordobe, Beograda i Leskovca
koji su mi pomogli u ovom radu.

VÍRIBUS UNÍTIS

UBI AMÍCI, IBÍDEM OPES. (*Plaut*)
Gde su prijatelji, tamo je i bogatstvo.

Ako neću ja sebi, ko će mi,
i ako sam ja sâm – šta sam,
i ako ne sada a kada?

(TALMUD)

